



Rôle du cil primaire au cours de la différenciation adipocytaire

Nicolas Forcioli-Conti

► To cite this version:

Nicolas Forcioli-Conti. Rôle du cil primaire au cours de la différenciation adipocytaire. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2015. Français. NNT : 2015NICE4119 . tel-01291666

HAL Id: tel-01291666

<https://theses.hal.science/tel-01291666>

Submitted on 21 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE NICE SOPHIA ANTIPOLIS, UFR SCIENCES
École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (ED85)

THESE

Pour obtenir le titre de

Docteur en Science de la Vie et de la Santé

Spécialité : Interactions moléculaires et cellulaires

Présentée et soutenue par

Nicolas Forcioli-Conti

Le 15 décembre 2015

Rôle du cil primaire au cours de la différenciation adipocytaire

Jury

Docteur Jean François Tanti

Président du jury

Docteur Isabelle Dugail

Rapporteur

Docteur Alexandre Benmerah

Rapporteur

Docteur Pascal Peraldi

Directeur de thèse

AVENIR DE LA SCIENCE. – La science donne à celui qui y consacre son travail et ses recherches beaucoup de satisfaction, à celui qui en *apprend* les résultats, fort peu. Mais, puisque peu à peu toutes les vérités importantes de la science deviennent ordinaires et communes, même ce peu de satisfaction cesse d'exister : de même que nous avons depuis longtemps cessé de prendre plaisir à connaître l'admirable *Deux fois deux font quatre*. Or, si la science procure par elle-même toujours moins de plaisir, et en ôte toujours davantage en rendant suspects la métaphysique, la religion et l'art consolateurs, il en résulte que cette grande source du plaisir se tarit, à laquelle l'homme doit presque toute son humanité. C'est pourquoi une culture supérieure doit donner à l'homme un cerveau double, quelque chose comme deux compartiments du cerveau pour sentir, d'un côté, la science, de l'autre, ce qui n'est pas la science : existant côte à côte, sans confusion, séparables, étanches : c'est là une condition de santé. Dans un domaine est la source de force, dans l'autre le régulateur : les illusions, les préjugés, les passions doivent servir à échauffer, l'aide de la science qui connaît doit servir à éviter les conséquences mauvaises et dangereuses d'une surexcitation. Si l'on ne satisfait point à cette condition de la culture supérieure, on peut prédire presque avec certitude le cours ultérieur de l'évolution humaine : l'intérêt pris à la vérité cessera à mesure qu'elle garantira moins de plaisir ; parce qu'il s'y attache du plaisir, l'illusion, l'erreur, la fantaisie reconquerront pas à pas leur territoire auparavant occupé : la ruine des sciences, la rechute dans la barbarie en seront la conséquence prochaine ; de nouveau, l'humanité devra recommencer à tisser sa toile, après l'avoir, comme Pénélope, détruite pendant la nuit. Mais qui nous garantit qu'elle en retrouvera toujours la force ?

Nietzsche

Humain trop humain. 251.

« La science ne nous dit pas ce que nous devons penser, mais parfois elle nous indique ce que nous ne pouvons plus croire »

Etienne Klein

Remerciements

Je tiens en premier lieu à adresser mes sincères remerciements au docteur Isabelle Dugail et au docteur Alexandre Benmerah qui ont accepté de juger mon travail de thèse et d'en être les rapporteurs. Je remercie également le docteur Jean François Tanti d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je tiens à remercier particulièrement le docteur Christian Dani pour m'avoir permis de réaliser mon Doctorat au sein de son laboratoire et pour le vif intérêt qu'il porte aux étudiants au sein de son équipe.

Il me serait impossible de ne pas remercier mon directeur de Thèse, le docteur Pascal Peraldi. Je tiens à te remercier pour la confiance que tu m'as accordée pendant ces trois années. La première fois que je t'ai rencontré quand je cherchais un stage pour mon master 2 tu m'as dit : « Voilà ! Avant la différenciation, il y a un cil, après la différenciation il y en a plus. Le stage c'est d'étudier ça ! » J'ai signé, et résultat je n'ai, de mon côté, absolument aucun regret. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi et les discussions que nous avons pu avoir sur le progéniteur adipeux ou sur le diabète ou encore sur les MAP kinases auxquelles je ne comprends encore rien ou sur Call of Duty !!! J'ai plus appris avec toi qu'en 5 ans de fac alors MERCI !!!

Merci à Anne Bouloumié et David Estève pour leur contribution sur le second papier.

CHRISTOPHE, ahhh mon Chrichri, mon collègue de paillasse, mon voisin de culture, mon pote de beuverie, mon ami tout court. On aura fait toutes nos études ensemble, jusqu'à faire notre doctorat dans le même labo. Merci pour tous ces bons moments et pour toutes les fois où j'ai eu besoin de toi. Tu vas faire une super thèse j'ai aucun doute la dessus alors courage !

Claudine, t'es une personne comme on en fait peu, mais malgré ton jeune âge tu es déjà complètement droguée !!!! Je t'en prie Claudine il faut que tu commences à penser à te soigner

des tests MTT et du L2. On t'a accordé un an de plus pour que tu sortes de cette terrible addiction et que tu nous fasses un joli papier alors fonce !!!

Comment est-ce que je ne pourrais ne pas remercier Annie Ladoux, que nous, étudiants, nous appelons discrètement et affectueusement Maman, certainement à cause de sa méthode de dressage des étudiants se basant sur l'attribution d'une récompense inductrice de l'adipogenèse du type : bonbons, sucrerie, brioche à chaque fois que nous réalisons une bonne action au sein du laboratoire. Alors merci pour tout Annie et ces 3 ans de récompense et de soutien.

Merci à Claude pour ton humour et toutes les fois où tu m'as appelé Nicole pour me saluer au labo. Tu vois je t'en veux pas !!!!!!! Alors merci mon Glaude et fais attention à Claudine !

Merci à toutes les autres personnes actuelles ou anciennes du labo, Nicole, Brigitte, Phi qui reviendra bientôt j'espère, Julian (courage pour ton nouveau travail), Pauline pour toutes les conversations, les soirées et la journée ski, Anne-Laure pour tous tes conseils.

Good luck to newcomers Xi and Martin, and be careful the end arrives faster than you think!

Merci à toute l'équipe de Zoubir, pour tous leurs conseils, Jean-Claude, Didier pour les cafés et tous les bons moments. Rayane arrêtes de vouloir tuer tout le monde et de t'inquiéter que les personnes à l'étage finissent bien leur assiette. Courage pour l'écriture de ta thèse, c'est pas la partie la plus amusante, mais tu vas y arriver.

Merci à Jonathan et à Yann d'être aujourd'hui devenu de véritables amis et pour tous nos débats scientifiques autour d'un verre qui se finissent en général par : « mais puisque je te dis que.....de toute façon j'ai raison »

Merci à Fulko et Lucas d'avoir toujours été là quand j'ai eu besoin de vous, et pour avoir compris mon léger éloignement depuis ces 3 ans.

Merci à Kelly pour tout ce que tu fais pour moi jument je ne sais pas comment j'aurais fait sans toi !

Enfin merci à mes parents de m'avoir accompagné dans mes études et pour m'avoir toujours laissé faire ce qui me plaisait dans la vie !

Résumé

Le cil primaire (CP) est une organelle présente chez l'Homme dans la grande majorité des cellules. Lors du développement le CP est d'une importance capitale, puisqu'il contrôle les voies de signalisation comme Hedgehog ou Wnt. Certaines pathologies génétiques affectant spécifiquement le CP, engendrent une obésité. Au cours de ma thèse je me suis intéressé à l'évolution du CP au cours de l'adipogenèse des cellules souches mésenchymateuses. Les résultats que nous avons obtenus indiquent que le cil est présent dans les cellules indifférenciées. Peu après l'induction de la différenciation il subit une importante phase d'élongation, suivi d'une diminution de sa taille, et fini par disparaître dans les cellules différenciées en adipocytes. L'élongation de la taille du cil ne semble pas affecter la localisation des protéines qui lui sont associées comme Kif3-A ou Smoothened, une protéine importante de la voie Hedgehog. Bien que la localisation de ces protéines reste inchangée par l'élongation du CP, la voie de signalisation Hedgehog est inhibée après trois jours de différenciation et les cellules ont développé une résistance à Sonic Hedgehog.

Dans un deuxième temps, nous avons tenté de déterminer les mécanismes responsables des changements morphologiques du CP pendant l'adipogenèse. Pour cela nous avons étudié le rôle d'HDAC6 qui est décrite comme responsable du désassemblage du CP pendant la mitose. Au cours de la différenciation adipocytaire, l'expression d'HDAC6 augmente. L'inhibition d'HDAC6 pendant la différenciation conduit à une forte diminution de l'adipogenèse, qui est associée à une diminution de l'élongation de la taille du cil. De façon surprenante, la surexpression d'HDAC6 conduit de la même manière à une inhibition de la différenciation et à un blocage de l'élongation de la taille du cil. Ces résultats montrent que la surexpression d'HDAC6 au cours de l'adipogenèse n'est pas suffisante pour induire la perte du cil, bien qu'elle ait un effet sur la dynamique du cil et sur l'adipogenèse. Ces résultats suggèrent l'existence d'un autre mécanisme conduisant à la perte du cil dans lequel HDAC6 pourrait être impliqué.

LISTE DES ABREVIATIONS

ATP	Adenosine triphosphate
ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
AdipoR	Adiponectin Receptor
AGAPT	Acylglycérol-3-phosphate O-acyltransférase
AgRP	Agouti-related peptide
ALMS	Alström syndrome
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	AMP-activated protein kinase
aP2/FABP4	adipocyte protein 2 / fatty acid-binding protein 4
ACS	acyl-CoA synthétase
ATGL	Adipose triglyceride lipase
BBS	Bardet Biedl syndrome
BMAL1	Brain and muscle ARNT-like protein 1
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding proteins
CART	Cocaine-and amphetamine regulated transcript
CCT	Chaperonin containing TCP-1
Cep97	centrosomal protein 97kDa
CHOP10	C/EBP homologous protein 10
CI	Cubitus Interruptus
COS2	Costal2
COUP-TF	COUP transcription factor
CP110	Centrosomal protein of 110 kDa

CREB	cAMP response element-binding protein
CRP	C-reactive protein
DEC1	Deleted in esophageal cancer 1
DIPA	Delta-interacting protein A
DvL	Dishevelled
DYNC2	Dynein Cytoplasmic 2
DYNLL	Dynein Light Chain, LC8-Type 1
EVC	Ellis Van Creveld
FABPpm	Fatty acid-binding protein plasma membrane
FAS	Fatty acid Synthase
FATP	Fatty acid Transporter Protein
FDG	F-fluoro-déoxy-glucose
FGF	Fibroblast Growth Factor
FTM	Fantom
FU	Fused
Fz	Frizzled
GAPT	glycéro-3-phosphate acyltransférase
GATA2/3	GATA Binding Protein 2/3
GILZ	Glucocorticoid-induced leucine zipper
GliA	Glioblastoma activator
GLiR	Glioblastoma repressor
GLUT4	Glucose transporter type 4
GPCR	G-protein-coupled receptors
GPI	glycosphosphatidylinositol

GSK3	Glycogen synthase kinase 3
GTP	Guanosine triphosphate
hASC	human Adipose Stem Cell
HDAC	Histone deacetylase
HEF1	Human Enhancer of Filamentation
HSF1	Heat Shock Factor 1
Hsp90	Heat Shock Protein 90
IFT	Intraflagellar transport
IL6	Interleukine 6
IMC	Indice de masse corporelle
Int1	Integration site 1
IRS-1	Insulin Receptor Substrate 1
KIF	Kinesin Family Member
KLF	Kruppel-like factors
LC8	idem à DYNLL
LepR	Leptin receptor
LHS	Lipase Hormono Sensible
LPL	Lipoprotéine Lipase
LRP	LDL related Protein
MARK4	MAP/Microtubule affinity-Regulating Kinase 4
MCHR1	Melanin-Concentrating hormone receptor 1
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MEK1/2	Mitogen-Activated Protein kinase kinase
MGL	Monoglycéride Lipase

MKS1	Meckel syndrome type 1 protein
Nde-1	NudE Neurodevelopment Protein 1
NFATC	Nuclear factor of activated T cell cytoplasmic
NPH	Néphronophtise
NPHP	Néphronophtise Protéine
NpY	Neureuptide Y
ODF2	Outer Dense Fiber Of Sperm Tails 2
OFD1	Oral-Facial Digital Syndrome 1
OSM-3	Osmotic avoidance abnormal protein 3
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PEPCK	Phosphoénol pyruvate carboxykinase
PER2	Period Circadian Clock 2
PKA	Protéine kinase A
POMC	Pro-opio melanocortin
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	Peroxisom proliferator response element
ROS	Reactiv oxygen species
SETDB1	SET Domain Bifurcated 1
SMO	Smoothened
SREBP-1	Sterol regulatory element-binding protein 1
SSTR3	Somatostatin Receptor 3

SVF	Sérum de Veau foetal
TCF	T-cell factor
TCP-1	T-Complex protein 1
TNF	tumor necrosis factor
TRiC	TCP-1 ring complex
TRPV	Transient receptor potential Vanilloid
TTBK2	Tau Tubulin Kinase 2
UCP1	Uncoupling Protein 1
VCP	Valosin containing protein
Wg	Wingless

Table des matières

Introduction générale	1
Historique	2
I. Généralités sur le Tissu Adipeux.....	6
I.1 Adipocyte Brun	6
I.2 Adipocyte Brite	9
I.3 Présentation du tissu adipeux blanc	10
I.4 Fonctions du Tissu Adipeux Blanc	12
I.5 Production et stockage de l'énergie.....	13
I.5.1 Devenir des triglycérides provenant de l'alimentation	13
I.5.1.1 Lipoprotéine lipase	14
I.5.1.2 Transport des acides gras dans le tissu adipeux.....	14
I.5.2 Lipogenèse au niveau du tissu adipeux blanc	15
I.5.2.1 Régulation de la lipogenèse	18
I.5.2.2 Synthèse des triglycérides.....	19
I.5.3 Biogenèse de la gouttelette lipidique.....	22
I.6 Lipolyse	23
I.6.1 Lipase hormono-sensible	24
I.6.2 Adipose triglycéride lipase	24
I.6.3 Monoglycéride lipase	25
I.6.4 Protéines associées aux lipases.....	25
I.6.4.1 Adipocyte protein 2 (aP2)/FABP4	25
I.6.4.2 ABDH5/CGI-58	26
I.6.4.3 Périlipines.....	26
II. Tissu adipeux et fonction endocrines	26
II.1 La leptine	27
II.2 L'adiponectine.....	28
III. Le progéniteur adipeux	31
III.1 Identification du progéniteur adipeux	31
III.2 Origines embryonnaires du progéniteur adipeux	32
III.3 Cellules hMADS	33
III.4 Isolement des cellules progénitrices à partir de tissu adipeux blanc.....	33

III.5 Prolifération et potentiel de différenciation des progéniteurs adipeux	35
IV. La différenciation adipocytaire	36
IV.1 La détermination adipocytaire	36
IV.2 La différenciation adipocytaire terminale	37
IV.2.1 PPAR	37
IV.2.2 PPAR γ	38
IV.2.3 C/EBP α	39
IV.2.4 PPAR γ et C/EBP α	40
IV.2.5 C/EBP β et C/EBP δ	40
IV.2.6 Les autres facteurs adipogéniques.....	41
IV.2.7 Les modifications d'histones.....	42
IV.3 Les autres mécanismes influençant l'adipogenèse.....	43
IV.3.1 Espèces réactives à l'oxygène	43
IV.3.2 Autophagie.....	43
IV.3.3 Rythme circadien.....	43
IV.3.4 Métabolisme des lipides.....	44
IV.4 L'inhibition de l'adipogenèse.....	44
V. Obésité.....	47
V.1 Apparition de l'obésité.....	48
V.2 Conséquences.....	49
VI. Le cil primaire.....	50
VI.1 Structure du cil primaire.....	51
VI.2 Transport intraflagellaire.....	57
VI.2.1 Les protéines motrices du transport intraflagellaire.....	58
VI.2.2 Les Complexes A et B du transport intraflagellaire	59
VI.2.3 Les protéines BBS (Bardet-Biedl Syndrome).....	60
VI.3 Ciliogenèse.....	63
VI.4 Contrôle de la ciliogenèse	67
VI.5 Modèles de contrôle de la taille du cil	72
VI.6 Désassemblage du cil	74
VI.7 La membrane ciliaire.....	76
VI.7.1 Le rôle de la poche ciliaire dans le trafic vésiculaire	76

VI.7.2 Le rôle des structures associées à la membrane ciliaire	78
VI.7.3 Transport des protéines membranaires au niveau du cil	78
VII. Cil primaire et contrôle des voies de signalisation	80
VII.1 Signalisation du PDGF α	80
VII.2 La voie de signalisation Wnt	82
VII.3 Signalisation Wnt et Cil primaire	83
VII.4 Cil primaire et signalisation Hedgehog.....	85
VII.4.1 La voie de signalisation Hedgehog chez les vertébrés est dépendante du transport intraflagellaire.....	85
VII.4.2 L'importance des protéines du corps basal dans la signalisation Hedgehog.....	87
VII.4.3 La localisation ciliaire des acteurs de la voie de signalisation Hedgehog	88
VII.4.4 Le transport intraflagellaire régule la voie de signalisation Hedgehog dans le cil	90
VII.4.5 Le rôle de Kif7	91
VIII Cil primaire et obésité.....	92
VIII.1 Cil et ciliopathies.....	93
VIII.2 Le rôle du cil primaire dans l'hypothalamus.....	94
VIII.3 Résistance à la leptine et obésité dans les ciliopathies.....	96
VIII.4 Cil primaire et sécrétions pancréatiques.....	97
VIII.5 Cil primaire et adipocyte	99
Résultats	102
I. HDAC6.....	103
I.2 HDAC6 : Structure et localisation cellulaire.....	105
I.3 HDAC6 : régulation et signalisation.....	105
I.4 Tubuline and Cortactine	106
I.5 Protéines reliées au stress.....	107
II. Rôles des glucocorticoïdes dans la lipogenèse, l'adipogenèse et la lipolyse.....	107
PUBLICATION 1.....	110
PUBLICATION 2.....	111
III. Discussion des deux articles	112
IV. Les raisons de l'allongement du cil au cours de la différenciation adipocytaire	114
IV.1 Autophagie	115
IV.2 HDAC6 et Autophagie	117

IV.3 Résultats obtenus	119
IV.3.1 Régulation de l'autophagie par la dexamethasone et la tubacine	119
IV.3.2 Autophagie et cil primaire	119
IV.4 Discussion des résultats sur l'implication du processus autophagique dans l'élongation du cil primaire	122
Références	123

Introduction générale

Historique

Lors des 150 dernières années, les différents travaux scientifiques ont changé profondément nos conceptions du tissu adipeux.

Au cours du XIX siècle, le tissu adipeux était considéré avec les travaux scientifiques de Toldt (1870) ou de Fleming (1871) comme un simple tissu conjonctif dans lequel se déposait des lipides (Fleming, 1871) (Toldt, 1870). Il était décrit comme un tissu inerte permettant leur stockage sans aucune activité métabolique. Depuis ces travaux, la microscopie optique permit à Maximov en 1927 de détailler clairement la cellule adipeuse. Par la suite, les travaux de Hausberger en 1938 (Hausberger, 1938), ont démontré que le tissu adipeux se formait à partir de cellules spécifiques, distinctes des fibroblastes du tissu conjonctif. Il apporte cette preuve en observant que l'implantation de tissus embryonnaires prélevés au niveau de sites connus pour évoluer en tissu adipeux, se développe chez un rat adulte en tissu adipeux et que l'on ne fait pas la même observation en implantant du tissu conjonctif. Toutefois, ces études morphologiques sont très limitées par les difficultés de la préparation des coupes de tissu adipeux et surtout par la résolution insuffisante de la microscopie optique. Ce problème sera résolu en partie par les apports de la microscopie électronique. L'obtention de coupes ultrafines de qualité avec préservation des lipides restera une difficulté technique importante, ce qui explique qu'à partir des années soixante, Napolitano (1963, 1965) sera l'un des seuls à avoir étudié les étapes successives de l'évolution des cellules adipeuses dites « à graisse blanche » au cours de l'accumulation de lipides (Napolitano, 1963) (Napolitano, 1965). De ce fait, les connaissances sur l'origine, la prolifération et l'évolution des cellules adipeuses restèrent très limitées à cette période. Suite à des travaux réalisés en microscopie électronique sur les dépôts adipeux du tissu mésentérique chez le porcelet, Vodovar montre en 1971 que chez le fœtus l'origine des préadipocytes est périvasculaire (Vodovar, 1971). En 1972, il fortifie ces observations et s'oppose à Fujita et Asagami qui réfutent l'origine périvasculaire des préadipocytes en invoquant l'absence de lame basale autour des cellules endothéliales (Fujita H., 1970). De plus, il met en évidence l'évolution des préadipocytes et des adipocytes, entre la naissance et l'apparition du dépôt adipeux puis pendant son développement. Dans un souci de clarification, il

est important de noter qu'à cette époque le terme adipocyte concerne les cellules adipeuses à partir du moment où les inclusions lipidiques ont fusionné en une seule masse de lipides. Le terme préadipocyte, quant à lui, concerne toutes les autres cellules aux différents stades de l'accumulation des lipides et les cellules sans lipides considérées comme futurs adipocytes. Le terme cellule adipeuse désigne l'adipocyte et le préadipocyte ayant déjà des inclusions lipidiques. Vodovar fera le constat que dès l'apparition des agrégats de cellules adipeuses, les préadipocytes, c'est-à-dire les adipocytes en devenir, sont toujours observés entre la paroi capillaire et les cellules adipeuses plus évoluées, ce qui en plus de la confirmation de la présence d'une lame basale au niveau des cellules endothéliales témoigne de l'origine périvasculaire des adipocytes. D'autres travaux, comme ceux de Napolitano en 1963, suggèrent que l'origine des préadipocytes ne soit pas la même pour tous les dépôts. Il n'est donc pas exclu que dans certaines conditions, des cellules d'origines variables puissent acquérir la capacité d'accumuler des lipides. Ainsi en condition pathologique, en prenant comme exemple la stéatohépatite, on fait le constat que les hépatocytes sont devenus des adipocytes au degré le plus élevé de l'accumulation des lipides.

Cependant il apparaît important de remettre les choses dans leur contexte. En effet, les cellules souches adultes sont découvertes en 1961 par le Dr McCulloch et Till qui mettent en évidence l'auto-renouvellement de certaines cellules dans la moelle osseuse de souris (McCulloch and Till, 1960). Elles ont été pendant longtemps limitées à l'hématopoïèse et leur généralisation à l'ensemble des tissus de l'organisme s'est faite récemment. De ce fait, l'hypothèse de la cellule progénitrice de l'adipocyte n'est pas encore envisagée à cette époque.

En parallèle, l'innervation du tissu adipeux était très discutée. Hofmeister en 1912 soutenait que la régulation du niveau de lipides dans le tissu adipeux n'est pas sous un contrôle nerveux. Goering s'oppose à ce constat en 1922 sur la base d'observation clinique. En effet il observe que la paralysie entraîne une augmentation de dépôts adipeux, alors qu'une stimulation nerveuse excessive engendre une perte de poids. Le débat avançait fortement grâce à Boeck en 1933 qui prouvera l'innervation du tissu adipeux par l'obtention de coupes de très bonne qualité. La communauté scientifique ne répondra à cette question qu'assez récemment, puisque c'est par l'utilisation de traceurs neuronaux rétrogrades et de traceurs viraux trans-

synaptiques que les fibres allant du cerveau aux différents dépôts adipeux ont été identifiées par l'équipe de Bartness aux États-Unis dans les années 90 (Youngstrom and Bartness, 1995) (Bamshad et al., 1998). L'ensemble de ces données montre que le tissu adipeux blanc reçoit des informations du système nerveux central qui font partie du système nerveux sympathique engendrant ainsi la libération de noradrénaline en de multiples sites.

Alors qu'on découvre les cellules souches hématopoïétiques, on commence à porter une attention particulière au métabolisme du tissu adipeux. Ainsi, Vaughan et Jeanrenaud vont montrer que le tissu adipeux est sensible à différentes hormones (Jeanrenaud, 1961) (Vaughan, 1961). En 1963 Rodbell sera l'un des premiers à travailler avec des adipocytes en culture (Rodbell, 1964). Il les purifie à partir de tissu adipeux de rat digéré à la collagénase ce qui lui permet d'éliminer la fraction stroma-vasculaire (SVF), c'est-à-dire toutes les cellules autre que les adipocytes. Ces travaux permettent de confirmer la sensibilité des adipocytes à certaines hormones comme l'insuline qui a pour effet d'augmenter la quantité d'acide gras des adipocytes indépendamment de la concentration du milieu en glucose, mais aussi de confirmer la capacité des adipocytes à relarguer des acides gras libres sous l'effet d'autres hormones comme l'ACTH et la TSH. Ces résultats changent notre conception du tissu adipeux, considéré alors comme un simple tissu conjonctif dans lequel les acides gras se déposaient. Il devient un tissu avec son métabolisme propre, composé de cellules spécialisées (les adipocytes) produisant des triglycérides, les stockant et les relarguant sous forme d'acide gras. L'adipocyte perd alors son statut de fibroblaste chargé de lipides.

Cette même année, George J. Todaro et Howard Green mettent au point une lignée de fibroblastes embryonnaires de souris qu'ils appellent les 3T3 (Todaro and Green, 1963). Ils décrivent leur comportement prolifératif dans différentes conditions ainsi que leur morphologie. Dix ans plus tard, en 1973, Green et Kehind publient un article dans lequel ils expliquent que les 3T3 accumulent des lipides lorsqu'ils les laissent un certain temps à confluence (Kehinde, 1974). Ces cellules chargées de lipides apparaissent en groupe dans la boîte de culture ce qui suggère qu'elles sont liées de façon clonale. Cette observation va les amener à établir des clones qui ont cette tendance, mais à un degré bien plus élevé : les 3T3-L1 et les 3T3-L2. En 1974 Green et Meuth confirment que les clones 3T3-L1 font partie du lignage

adipocytaire et que la conversion des 3T3-L1 de préadipocyte en adipocyte implique un processus de différenciation qui peut être étudié en culture cellulaire (Green and Meuth, 1974) (Green and Kehinde, 1975).

Les lignées de progéniteurs adipocytaires comme les 3T3-L1 obtenues chez la souris, puis plus tard les CH310T1/2 murines ou les hMADS humaines vont permettre de grandes avancées sur la compréhension de la prolifération des progéniteurs d'adipocytes, mais vont également permettre la découverte des divers facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes de l'adipocyte. On les utilisera également pour comprendre l'effet de mécanismes d'action qui ne peuvent pas être abordés sur les adipocytes matures dont la conservation en culture est restreinte. Enfin leur utilisation est fréquente afin d'identifier les impacts de diverses molécules pharmacologiques sur les processus de différenciation adipocytaire.

Au cours de ce manuscrit nous allons dans un premier temps essayer de faire une présentation des connaissances actuelles que nous avons sur le tissu adipeux ainsi que sur son développement. Dans un second nous détaillerons une organelle appelée : cil primaire qui a été récemment impliquée dans l'homéostasie énergétique et le développement du tissu adipeux.

I. Généralités sur le Tissu Adipeux

Chez l'homme, la régulation de l'équilibre énergétique est un paramètre essentiel pour le maintien des fonctions vitales de l'organisme. Divers organes et tissus vont permettre d'assurer cette fonction comme le cerveau, le foie, le muscle, mais aussi le tissu adipeux. Ce dernier est considéré comme le principal organe de stockage de l'énergie de l'organisme ce qui lui permet d'assurer l'équilibre entre les apports et les besoins énergétiques. Il est relativement important, puisqu'il représente 15 à 20% de la masse totale chez l'homme et entre 20 et 25% chez la femme. Outre ses fonctions de stockage et de relargage de l'énergie, il est aussi un tissu de soutien, protégeant et soutenant les organes internes et d'adaptation au froid par thermogénèse.

Chez les mammifères, on distingue 3 types d'adipocytes :

- l'adipocyte brun
- l'adipocyte brite
- l'adipocyte blanc

I.1 Adipocyte Brun

L'adipocyte brun est multiloculé, et présente un niveau élevé de mitochondries. Contrairement au tissu adipeux blanc, la fonction du tissu adipeux brun n'est pas de stocker l'énergie, mais de l'utiliser pour faire de la thermogénèse (Nicholls and Locke, 1984). Cette activité est assurée par la protéine mitochondriale transmembranaire UCP1 (Uncoupling Protein 1), décrite comme étant spécifique du tissu adipeux brun, et dont la fonction est de diminuer le gradient de proton généré par la phosphorylation oxydative (Ricquier and Kader, 1976). Pour cela elle augmente la perméabilité de la membrane mitochondriale interne permettant ainsi aux protons de passer de l'espace inter membranaire à la matrice mitochondriale (Figure 1).

Dans les mitochondries ne participant pas à la thermogénèse, la respiration et la synthèse de l'ATP sont couplées. Dans les mitochondries des adipocytes bruns, la présence d'UCP1 va engendrer une diminution du gradient électrochimique de protons court-circuitant l'ATP synthase. Cela active fortement la respiration dont l'énergie, n'étant plus utilisée pour phosphoryler l'ADP, est dissipée sous forme de chaleur. L'activité thermogénique des

adipocytes bruns de rongeurs a été vérifiée en quantifiant la chaleur produite à partir d'adipocytes bruns isolés. Ainsi il a été calculé qu'un kilogramme de tissu adipeux brun de hamster ou de rat dissipe entre 300 et 500 Watts. Sachant que l'ensemble du métabolisme basal chez l'Homme dissipe entre 120 et 150 Watts, une faible quantité de tissu adipeux brun contribuerait à une fraction très significative de la balance énergétique et le contrôle du poids corporel (Nedergaard et al., 1977; Ricquier et al., 1979; Seydoux and Girardier, 1977).

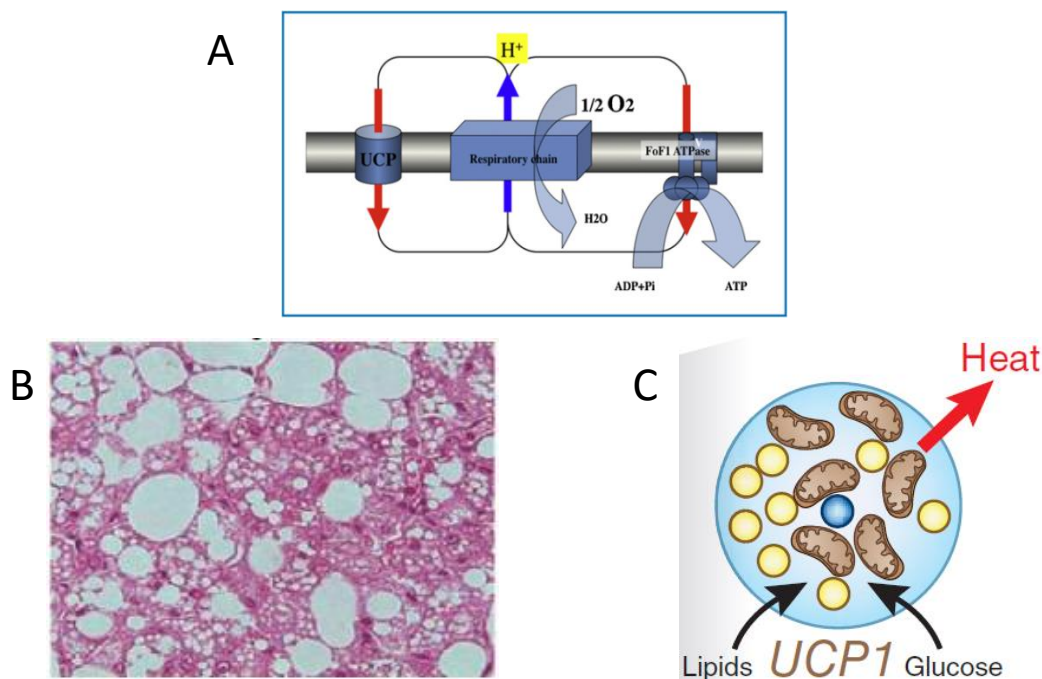


Figure 1 : (A) Circuit de protons à travers la membrane mitochondriale des mitochondries des adipocytes bruns. *Illustration d'après (D. Ricquier 2013)* (B) Coupe de tissu adipeux brun colorée à l'hématoxiline éosine d'après (Cypess et al, 2013) (C) Schéma de la morphologie d'un adipocyte brun d'après (Nedergaard and Cannon, 2013)

L'observation que les souris $UCP1^{-/-}$ ne sont pas obèses est cependant contraire à cette idée. Toutefois, il a été montré qu'elles accumulent des triglycérides si elles sont élevées à 30°C, la température de neutralité thermique (Feldmann et al., 2009).

Chez l'Homme, on a longtemps pensé que le tissu adipeux brun n'était présent que chez le nouveau-né dans les régions cervicales, axillaires et périrénales et qu'il contribuait à l'homéothermie de celui-ci. Le tissu adipeux brun sera mis en évidence chez l'adulte par l'arrivée de la tomographie à émission de positron (PET-Scan) en présence de ^{18}F -fluoro-déoxy-glucose (^{18}F FDG), développée à l'origine pour rechercher des tumeurs, généralement

consommatrices de glucose. Cette technique s'avère efficace et permet de détecter des métastases. Toutefois, l'interprétation des résultats d'examen reste difficile. En effet, les images obtenues par PET-Scan décrivent des zones positives pour la présence de ^{18}F FDG dans des régions très symétriques de la région du cou ou dans la cage thoracique ou encore les régions périrénales, en désaccord avec une distribution anatomique symétrique des métastases (Figure2).

Rapidement les communautés scientifiques et médicales ont proposé qu'il s'agissait de masse de tissu adipeux bruns. Ces données furent rapidement acceptées par les radiologues et oncologues, à tel point que certains radiologues oncologues exposent les patients à une température élevée avant de pratiquer un PET-Scan, la chaleur inhibant l'activité des adipocytes bruns. La présence d'adipocytes bruns caractérisés par leur morphologie et leur expression d'UCP1 est révélée par l'analyse de biopsies. Néanmoins la confirmation que ces zones correspondent à du tissu adipeux brun est toujours débattue par la communauté scientifique. Divers travaux tendent à montrer que ces dépôts de tissu adipeux chez l'adulte seraient en réalité constitués d'adipocytes blancs et non d'adipocytes bruns.

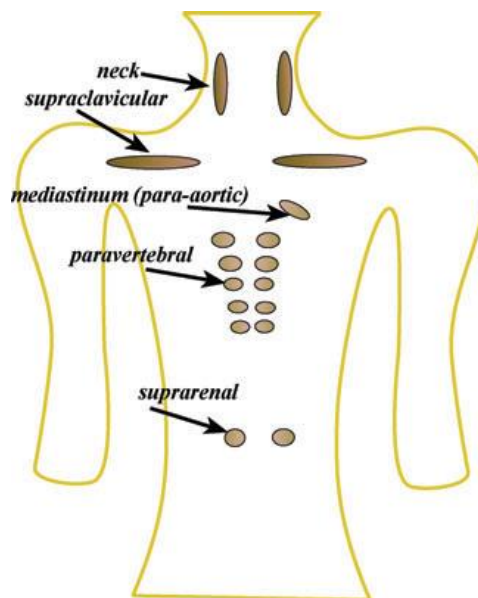


Figure 2 : Les dépôts de tissu adipeux bruns chez l'adulte humain
Illustration d'après Jan Nedergaard et al., 2011

I.2 Adipocyte Brite

Il a été observé chez la souris que différents dépôts de tissus adipeux blancs peuvent contenir des cellules caractéristiques des adipocytes bruns (Loncar, 1991; Young et al., 1984). On a appelé ces cellules des adipocytes brites pour « brown in white adipocyte » (Petrovic et al., 2010; Schulz et al., 2013). Leur morphologie est très similaires à celle des adipocytes bruns (Figure 3). Ils sont multiloculés et présentent les propriétés fonctionnelles (incluant l'expression d'UCP1) des adipocytes bruns. En dehors de leur localisation différente, d'autres caractéristiques dissocient les adipocytes brites des bruns, comme leur origine de développement, leur taille et le niveau d'expression de certains transcrits (Walden et al., 2012; Wu et al., 2012; Xue et al., 2007). Les études in vivo comparant le transcriptome entre le tissu adipeux blanc enrichi en adipocyte brite et le tissu adipeux brun révèlent des différences. Cependant ces analyses étant réalisées à partir de tissu entier, ces résultats ne permettent pas de déterminer s'il s'agit de propriétés du tissu ou de caractéristiques intrinsèques aux cellules. Toutefois lorsqu'on s'appuie sur ces résultats, on peut dire que les adipocytes du tissu adipeux brun humain adulte ressemblent davantage à des adipocytes brites, mais on peut confirmer qu'on est bien en présence de tissu adipeux brun chez le nouveau-né (Sharp et al., 2012; Wu et al., 2012). Il reste cependant difficile de dissocier clairement les adipocytes brites et les

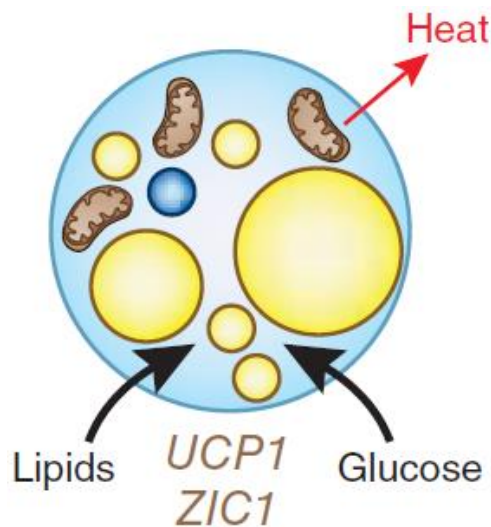


Figure 3 : Schéma de la morphologie d'un adipocyte brite
Illustration d'après (Nedergaard and Cannon., 2013)

adipocytes bruns. En effet, il n'y a pas d'évidence que la fonction des adipocytes bruns diverge de celle des adipocytes blancs *in vivo*. De plus, ils sont très comparables au niveau de leur signature moléculaire et de leur morphologie (Figure 4).

I.3 Présentation du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc dont nous parlerons exclusivement dans la suite de ce travail, se développe à partir du troisième trimestre de gestation et se développe principalement pendant la première année du nouveau-né et se répartit différemment à l'adolescence sous l'effet des différentes hormones sexuelles.

C'est le tissu adipeux le plus imposant, puisqu'il représente 15 à 20% du poids normal chez l'homme et 20 à 25% du poids normal chez la femme. Bien qu'étant décrit comme blanc, la couleur de ce tissu va varier du blanc au jaune foncé suivant la quantité de pigments caroténoïdes apportés par l'alimentation. Il est constitué d'adipocytes blancs matures qui contiennent une seule gouttelette de lipide entouré par une fine couche de cytoplasme faisant la liaison avec la membrane plasmique. Au sein du tissu, les adipocytes sont tassés les uns contre les autres et adoptent une forme polyédrique. Ils sont séparés par des fibres de réticuline, de très nombreux capillaires sanguins ainsi que par des fibres nerveuses noradrénergiques. Les adipocytes sont organisés en lobules faisant 5 mm de diamètre distinguable à l'œil nu qui sont séparés par de fines cloisons conjonctives contenant des fibroblastes, des macrophages, des mastocytes et des fibrilles de collagène. On distingue alors deux fractions cellulaires dans le tissu adipeux :

- La fraction adipocytaire qui est composée des adipocytes
- La fraction stroma-vasculaire qui est composée des autres types cellulaires se trouvant dans le tissu adipeux à savoir des cellules sanguines, des cellules endothéliales, des cellules immunitaires (macrophages (Aron-Wisniewsky et al., 2009), mastocyte (Liu et al., 2009) et cellules « natural killer » (Henegar et al., 2008)) et des péricytes. Enfin on observe la présence de cellules de type fibroblastique dans lesquelles se trouvent les progéniteurs des adipocytes (progéniteurs non identifiés) et des cellules progénitrices

multipotentes, capables de se différencier en d'autres types cellulaires d'origine mésenchymateux comme les ostéoblastes ou les chondrocytes (Figure 4) .

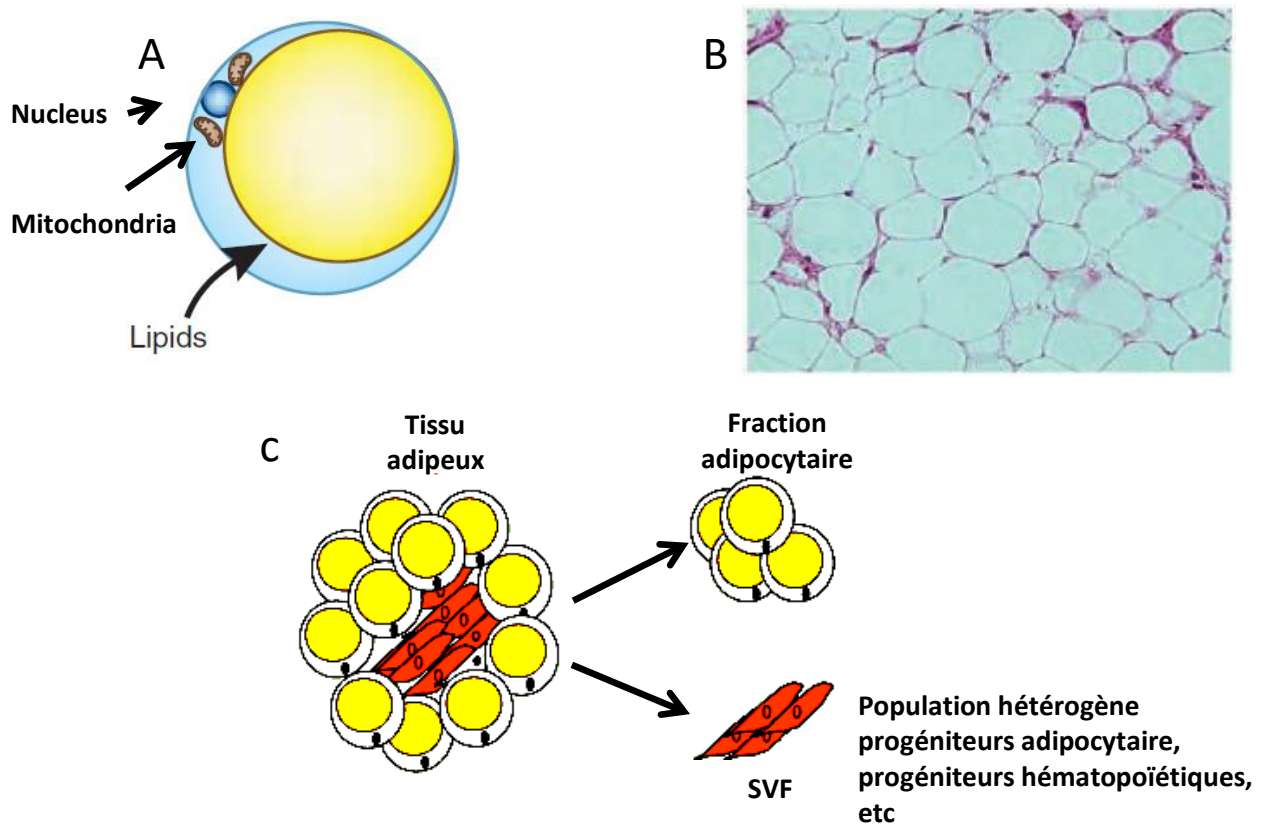


Figure 4 : (A) Schéma représentant un adipocyte blanc d'après (Nedergaard and Cannon., 2013) (B) Histologie du tissu adipeux blanc d'après (Cypess et al., 2013) (C) Schéma représentant les deux fractions cellulaires contenues dans le tissu adipeux et pouvant être dissociées par centrifugation. Illustration de (Dani et Casteilla., 2006).

Au sein du tissu adipeux blanc, on distingue deux types de dépôts : le tissu adipeux viscéral et le tissu adipeux sous cutané.

Au cours de l'adolescence, suivant le sexe, la répartition du tissu adipeux sous cutané va se faire différemment. Il va se répartir principalement au niveau du cou, du ventre et des épaules chez l'homme et se localiser sur la poitrine les hanches, les cuisses et les fesses chez la femme (Figure 5). Le tissu adipeux viscéral est constitué des compartiments rétropéritonéaux et intrapéritonéaux qui est lui-même constitué du tissu adipeux omental, mésentérique et chez les rongeurs périgonadal. La délimitation entre les tissus adipeux intra- et rétropéritonéaux est située le long de la surface ventrale du rein, et de la surface dorsale des intestins. Une

augmentation de la masse du tissu adipeux viscéral, lors de l'obésité par exemple est directement corrélée avec la résistance à l'insuline, à l'altération du niveau plasmatique de lipoprotéines, à l'augmentation des concentrations de triglycérides et de cholestérol ainsi qu'à l'hypertension et à la dyslipidémie.

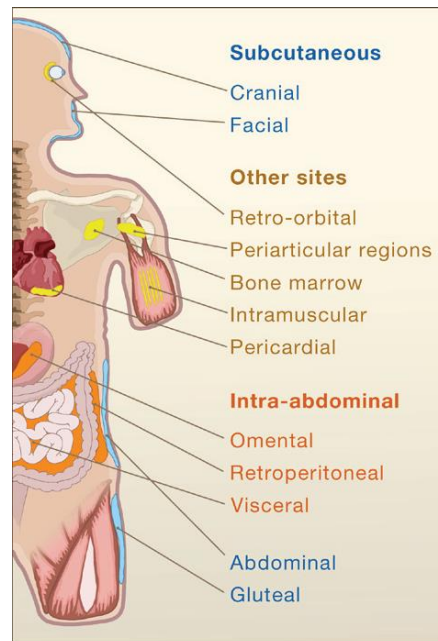


Figure 5 : Distribution dans l'organisme des principaux dépôts de tissu adipeux blanc chez l'homme. *Illustration d'après Gesta S et al., 2007*

I.4 Fonctions du Tissu Adipeux Blanc

Dans le tissu adipeux blanc, les acides gras sont stockés sous forme de triglycérides formés d'une molécule de glycérol sur laquelle sont estérifiés trois acides gras. Chez un jeune adulte sans surpoids, les triglycérides stockés représentent une réserve d'énergie comprise entre 90000 et 180000 kcal. Cette énergie peut être libérée sous forme d'acides gras en cas de carence énergétique pour les besoins des organes oxydatifs comme les muscles squelettiques, le cœur, le cortex rénal, le foie. Le cerveau ne peut utiliser des acides gras qui ne passent pas la barrière hémato-encéphalique, mais peut oxyder leurs métabolites produits par le foie, les corps cétoniques. Le stockage des triglycérides dans le tissu adipeux blanc permet de survivre à un jeûne de 60 et 70 jours chez l'Homme. Cette période peut s'étendre jusqu'à 100 jours en cas d'obésité. Cette capacité très importante à stocker notre énergie fut certainement une capacité essentielle à la survie de notre espèce. Il s'avère malheureusement qu'elle reste essentielle dans

les pays qui n'ont pas d'accès quotidien à la nourriture, mais elle engendre aujourd'hui des problèmes de santé publique majeurs dans les pays développés.

En plus de cette fonction de stockage, le tissu adipeux blanc est maintenant reconnu comme un organe sécrétoire majeur capable de synthétiser une large variété de facteurs appelées adipokines, dont certaines modulent la sensibilité à l'insuline et l'équilibre énergétique.

Enfin, le tissu adipeux exerce une fonction importante de protection mécanique principalement au niveau des mains, de la plante des pieds et des fesses chez l'Homme.

I.5 Production et stockage de l'énergie

C'est le rôle le plus important du tissu adipeux blanc. En effet, son rôle majeur est de stocker l'énergie sous forme de triglycérides permettant à l'organisme de faire face à de longues périodes de jeûne. En stockant une importante quantité de triglycérides en captant la quasi-totalité des lipides circulants, il va constituer la réserve d'énergie la plus importante de l'organisme.

L'accumulation, ou la libération des triglycérides est contrôlée par la prise alimentaire et le jeûne, mais aussi par le stress ou l'activité physique et leurs conséquences sur les niveaux d'hormones sécrétées par différents organes comme le pancréas ou le cerveau. Ces différents niveaux d'hormones vont alors indiquer au tissu adipeux s'il doit libérer ses réserves énergétiques ou les accroître en modifiant la balance entre la captation des acides gras et la lipolyse.

I.5.1 Devenir des triglycérides provenant de l'alimentation

Du fait de leur importante hydrophobie les triglycérides provenant de l'alimentation vont être sécrétés à l'état postprandial par les entérocytes dans le système lymphatique sous forme de particules appelées chylomicrons qui passent ensuite dans le sang. Les chylomicrons sont des particules pouvant faire jusqu'à 450nm (Hussain, 2000) et sont composés d'un noyau de triglycérides et d'esters de cholestérol entourés par une membrane formée d'une

monocouche de phospholipides, de cholestérol libre et de lipoprotéines (aussi appelées apolipoprotéines).

I.5.1.1 Lipoprotéine lipase

Une fois dans la circulation sanguine, les chylomicrons vont être amenés par celle-ci au niveau du tissu adipeux. Pour entrer dans les adipocytes, les triglycérides doivent d'abord être hydrolysés en acide gras. Pour cela, les adipocytes synthétisent la lipoprotéine lipase (LPL), qu'ils exportent vers le côté luminal de l'endothélium capillaire. La LPL hydrolyse alors les triglycérides en acides gras et en 2-monoacylglycérol.

I.5.1.2 Transport des acides gras dans le tissu adipeux

Bien que les acides gras aient la capacité de traverser la membrane plasmique du fait de leur importante hydrophobicité, on sait aujourd'hui qu'ils entrent dans la cellule par un système de transport saturable. Un certain nombre de protéines impliquées dans ce processus ont été identifiées, parmi lesquelles on retrouve les protéines de la famille des FATP (fatty acid transporter protein) (Gimeno, 2007), le récepteur « scavenger » CD36 chez l'Homme connu sous le nom de translocase des acides gras chez le rongeur, et la protéine FABPpm de la membrane cellulaire liant les acides gras (fatty acid binding protein of the plasma membrane). Les FATP sont des protéines que l'on va retrouver dans différents tissus, FATP1 étant l'isoforme la plus exprimée dans le tissu adipeux blanc. Cette protéine est notamment sensible à une stimulation à l'insuline au cours de laquelle elle va migrer d'une localisation intracellulaire vers la membrane plasmique ce qui est suivi par une augmentation de l'entrée d'acides gras dans l'adipocyte (Wu et al., 2006). Le fait que CD36 soit présent sur les macrophages, ce récepteur membranaire fut d'abord impliqué dans la reconnaissance et l'élimination des organismes étrangers. Il est reconnu aujourd'hui comme un marqueur des adipocytes ayant la capacité de reconnaître des composants spécifiques des lipides et des lipoprotéines. Il facilite ainsi le transport des acides gras par un mécanisme qui reste aujourd'hui inconnu. Chez les souris CD36^{-/-} le transport des acides gras dans le tissu adipeux est réduit de 60% (Coburn et al., 2000).

I.5.2 Lipogenèse au niveau du tissu adipeux blanc

Chez les rongeurs, la lipogenèse contribue de manière importante à la constitution des réserves de triglycérides dans le tissu adipeux. Ce mécanisme se fait principalement dans le foie et dans le tissu adipeux blanc, et est dépendant de la nutrition de l'animal. Chez les animaux dont le régime est riche en glucides, l'activité lipogénique au sein du tissu adipeux blanc est très importante, alors qu'on observe l'inverse chez les animaux dont le régime est riche en lipides. En revanche, la contribution de la synthèse *de novo* d'acides gras dans l'accumulation des triglycérides de l'adipocyte humain reste un sujet extrêmement controversé. Bien qu'on pensait que la lipogenèse était complètement absente dans le tissu adipeux blanc chez l'homme (Shrago et al., 1969) (Patel et al., 1975) (Galton, 1968), des recherches récentes tendent à montrer qu'il existe bien une activité lipogénique produisant dans ce tissu, mais qu'elle reste très inférieure à la synthèse *de novo* d'acides gras hépatiques (Diraison et al., 2003). Les études réalisées afin de déterminer la sensibilité de ce processus aux régimes riches en glucides chez l'Homme ont amené des résultats contradictoires, où l'on pouvait observer chez certains patients que cela augmentait la lipogenèse (Aarsland et al., 1997; Acheson et al., 1988) alors que d'autres y étaient insensibles (Diraison et al., 2003). D'autres résultats montrent une corrélation très intéressante entre la taille de l'adipocyte et son activité de synthèse des acides gras. Ainsi, il a été observé qu'au sein d'un même dépôt adipeux chez un sujet sain, plus un adipocyte est petit, plus il exprime les enzymes lipogéniques et plus on y retrouve une accumulation d'acide palmitique et stéarique qui sont les produits finaux de la lipogenèse (Roberts et al., 2009).

La synthèse des acides gras est catalysée par la FAS (fatty acid synthase) dans le cytosol à partir de deux précurseurs : l'acétyl-CoA, le malonyl-CoA et le NADPH. Le produit primaire de la FAS est l'acide palmitique qui comprend une chaîne aliphatique de seize atomes de carbones, mais elle peut aussi produire l'acide stéarique (dix-huit atomes de carbones) et des acides gras plus courts. L'acide gras est assemblé à partir de l'acétyl-CoA initial en répétant des réactions de condensation avec le substrat donneur de carbones, le malonyl-CoA, ce qui permet d'ajouter deux carbones à chaque cycle de condensation. La synthèse du palmitate nécessite ainsi sept cycles de condensation entre l'acétyl-CoA primaire et le malonyl-CoA.

L'Acétyl-CoA provient en général de l'oxydation du pyruvate, de la β -oxydation des acides gras ou de la dégradation oxydative des acides aminés dits cétogènes. Quel que soit son origine il est toujours produit dans la mitochondrie. Son transport vers le cytosol se fait par sa condensation avec l'oxaloacétate pour former du citrate qui sera transporté à la travers la membrane mitochondriale interne par la citrate translocase. Une fois dans le cytosol, la citrate synthase va en présence d'ATP reconvertir le citrate en oxaloacétate et acétyl-CoA qui sera pris en charge par la protéine ACC (acétyl coenzyme A carboxalase) pour être converti en présence de CO_2 et d'ATP en malonyl-CoA (Figure 6 et Figure 7).

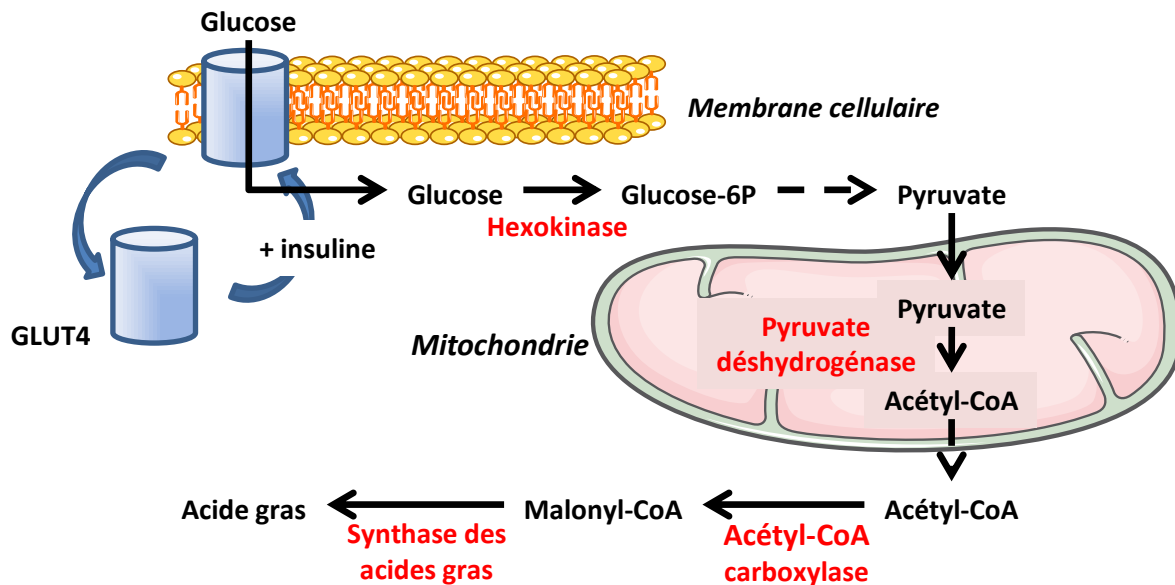


Figure 6 : Schéma de la lipogenèse adipocytaire. En présence d'insuline, le transporteur de glucose GLUT4 migre au niveau de la membrane cellulaire. Le transport de glucose est stimulé et le glucose entre dans l'adipocyte. Après phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate, celui-ci rentre dans la glycolyse pour produire du pyruvate. Le pyruvate entre dans la mitochondrie où il est transformé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase. L'acétyl-CoA sort de la mitochondrie par un système de navette. Il est ensuite transformé dans le cytoplasme en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase. Le malonyl-CoA est le substrat de la synthase des acides gras qui produit les acides gras.

La protéine FAS est présente dans le cytoplasme sous forme d'homodimère dont chacune des deux sous unités fait 273 kDa chez l'humain. Chaque monomère contient sept domaines requis pour la synthèse des acides gras :

- le domaine acyl carrier
- le domaine acyl transférase
- le domaine β -ketoacyl synthase

- le domaine β -ketoacyl reductase
- le domaine β -hydroxylacyl hydratase
- le domaine enoyl reductase
- le domaine thioesterase (Pour références : (Chirala and Wakil, 2004; Smith, 1994; Stoops et al., 1979; Wakil, 1989))

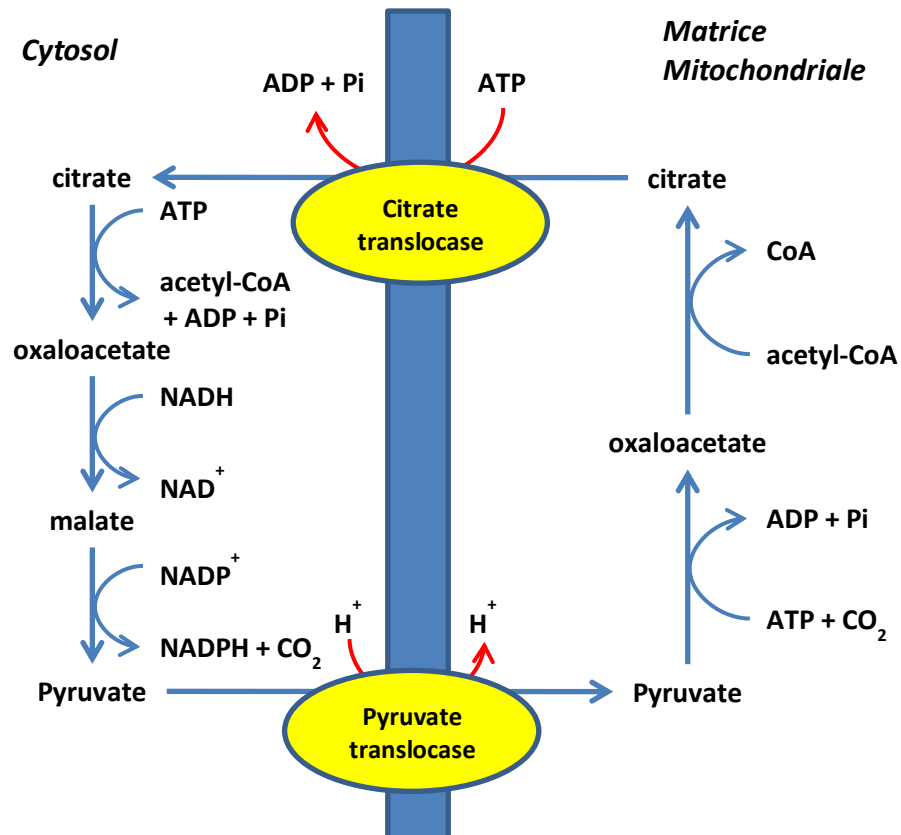


Figure 7 : Cycle du citrate permettant le transport de l'acétyl-CoA entre la matrice mitochondriale et le cytosol

Les deux premiers domaines permettent de capter les précurseurs d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA. Les quatre suivants permettent d'effectuer les réactions de condensation entre l'acétyl-CoA primaire et les molécules de malonyl-CoA. Le dernier domaine permet de libérer l'acide gras synthétisé de l'enzyme. De plus, bien que ces sites soient sur les deux sous-unités, la FAS n'est active que lorsque qu'elle est dimérisée (Stoops et al., 1979).

La synthèse des acides gras dont la chaîne est plus longue que celle de l'acide stéarique se poursuit soit dans la mitochondrie avec comme substrat donneur l'acétyl-CoA soit dans les microsomes (Witkowski et al., 2007).

I.5.2.1 Régulation de la lipogenèse

La régulation du métabolisme des acides gras se fait via deux mécanismes distincts. L'un est une régulation à court terme et l'autre se fait au niveau transcriptionnel. Le glucose est le principal substrat de la lipogenèse chez le rongeur et chez l'Homme.

L'entrée du glucose dans la cellule adipeuse constitue donc une étape importante dans la régulation de la lipogenèse à court terme. L'entrée du glucose se fait par le transporteur GLUT4. En réponse à l'insuline, celui-ci va migrer du compartiment intracellulaire à la membrane plasmique de l'adipocyte. Le comportement nutritionnel joue un rôle important dans la régulation à court terme de la lipogenèse. En effet au cours du jeûne, on observe une forte diminution du niveau d'insuline, et une augmentation des catécholamines, et inversement en cas de régimes riches en glucides. Le niveau de ces hormones, a pour effet de faire varier le niveau de phosphorylation d'un certain nombre d'enzymes lipogéniques et ainsi modifier leur activité. Les deux principales protéines affectées par ces modifications sont la pyruvate déshydrogénase (PDH) qui catalyse la décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA, et la protéine acétyl-coA carboxylase (ACC). La PDH est activée par l'insuline (Denton and Brownsey, 1983). Différentes hormones dont les concentrations changent avec le statut nutritionnel et auxquelles ACC est sensible, comme l'insuline et les hormones β -adrénergiques peuvent modifier son état de phosphorylation, ACC est régulée par différentes kinases comme la PKA qui est sensible à l'augmentation du niveau d'AMP cyclique pouvant être engendré par une stimulation par les hormones β -adrénergiques. ACC est aussi le premier substrat identifié de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) dans différents tissus (Winder et al., 1997). L'AMPK est considéré comme le senseur du niveau d'énergie intracellulaire. Lors d'un stress énergétique le rapport $[AMP]/[ATP]$ augmente activant l'AMPK qui inhibe ACC par phosphorylation (Kahn et al., 2005). La lipogenèse est alors inhibée et la β -oxydation des acides gras, en temps normal inhibée par le malonyl-CoA, est alors activée.

Les contrôles transcriptionnels sont quant à eux plus long à mettre en place, mais vont engendrer une modification du niveau d'expression des enzymes importantes pour la lipogenèse. Certaines enzymes sont régulées uniquement de façon transcriptionnelle, ce qui est le cas de la FAS. L'insuline et le glucose sont les deux principaux inducteurs de cette enzyme, qui lorsqu'ils agissent en synergie assurent une induction maximale de son expression (Foufelle et al., 1992; Moustaid et al., 1994). Il a été mis en évidence que les effets de l'insuline étaient relayés par le facteur de transcription SREBP-1c et ceux du glucose par ChREBP (Foufelle and Ferre, 2002; Postic et al., 2007). Bien que la pluparts de ces travaux aient été réalisés dans l'hépatocyte, il apparait que ces facteurs jouent un rôle important dans le contrôle de la lipogenèse adipocytaire. SREBP-1c est un facteur de transcription de la famille des b-HLH/LZ, qui est produit par épissage alternatif du gène SREBP-1. Il est très fortement exprimé dans le tissu adipeux blanc de rongeur et chez l'homme (Shimomura et al., 1997). SREBP-1c était d'abord considéré comme un gène important pour la différenciation adipocytaire (Tontonoz et al., 1993), puisque l'expression d'une forme dominante négative de SREBP-1c dans des lignées de 3T3-L1 engendre une forte inhibition de l'adipogenèse. De plus, sa surexpression favorise la différenciation adipocytaire lorsqu'elles sont cultivées en milieu adipogénique. Enfin, le groupe de Spiegelman a mis en évidence que SREBP-1c produit un ligand lipidique pour PPAR γ (Kim et al., 1998b). Bien que son rôle dans les modèles cellulaires soit bien établi, l'étude de ses fonctions dans les modèles animaux a donné des résultats contradictoires. En effet, on n'observe aucune perte d'expression des enzymes de lipogenèse dans le tissu adipeux blanc ni de perte de poids chez les animaux invalidés pour SREBP-1 (Sekiya et al., 2007). En revanche la surexpression dans le tissu adipeux chez les souris aP2-SREBP-1c présente une lipodystrophie importante qui tend à s'expliquer par un problème de différenciation des progéniteurs adipeux (Shimomura et al., 1998). Bien que le rôle de SREBP-1c soit clairement établi dans la lipogenèse hépatique, son implication dans celle du tissu adipeux soulève encore de nombreuses interrogations.

I.5.2.2 Synthèse des triglycérides

Une fois produit, les acides gras sont stockés sous forme de triglycérides, qui sont produits à partir de deux précurseurs :

- le glycérol, qui est communément admis pour provenir de la réduction du 3-phosphodihydroacétone par la 3-phosphoglycéroldéshydrogénase lors de la glycolyse. Cependant, de plus en plus de preuves tendent à montrer qu'une portion significative de glycérol est produite *de novo* par la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) lors du processus de glycéronéogenèse à partir de pyruvate, ce qui serait la principale source de glycérol dans le tissu adipeux (Ballard et al., 1967).
- l'acyl-CoA est généré par une protéine de la famille des acyl-CoA synthétases (ACS). Les ACS peuvent activer les acides gras avec des longueurs de chaîne de 12 à 20 carbones. ACS1 est la principale isoforme dans l'adipocyte et semble être localisée dans différents compartiments cellulaires comme la membrane plasmique, les microsomes, la gouttelette lipidique, la membrane mitochondriale (Soupene and Kuypers, 2008). L'inactivation d'ACS1 engendre une augmentation de la lipolyse ce qui tend à lui conférer un rôle important dans la ré-estérification des acides gras (Lobo et al., 2009).

Lorsqu'ils sont activés en acyl-CoA, les acides gras vont alors être stockés sous forme de triglycérides. Deux voies de synthèse sont utilisées dans la cellule. La première se fait à partir du monoacylglycérol qui va être pris en charge par la monoacylglycérol transférase pour former du diacylglycérol qui par la suite deviendra un triglycéride. Bien que cette voie fasse intervenir peu d'acteurs, elle reste mineure dans les adipocytes, où la quasi-totalité du monoacylglycérol est transformée en glycérol et en acide gras par la monoglycéride lipase (Fredrikson et al., 1986). La principale voie de biosynthèse dans les adipocytes, se fait à partir du glycérol-3-phosphate qui, en réagissant avec un premier acyl-CoA va former l'acide lysophosphatidique, puis d'un second acyl-CoA pour former l'acide phosphatidique, qui sera déphosphorylé pour former un diacylglycérol qui en réagissant avec un troisième acyl-CoA donnera un triglycéride. L'ensemble de ces réactions successives ne sont pas spontanées, mais sont catalysées par différentes enzymes :

- La glycéro-3-phosphate acyltransférase (GPAT) : c'est elle qui catalyse la première étape de la synthèse des triglycérides qui permet la formation de l'acide lysophosphatidique. Il existe quatre isoformes de cette protéine. GPAT1 et 2 sont localisées au niveau de la membrane mitochondriale externe, alors qu'on retrouve GPAT3 et 4 dans le réticulum

endoplasmique (Takeuchi and Reue, 2009; Wendel et al., 2009). Leur importance respective n'est pas évidente. GPAT1, bien que très fortement exprimée dans le tissu adipeux ne représente que 10% de l'activité totale des GPAT du tissu adipeux. GPAT3 est localisée dans le réticulum endoplasmique et est fortement exprimée dans le tissu adipeux de rongeur et plus faiblement dans celui de l'humain. Dans les adipocytes 3T3-L1, un knockdown de GPAT3 induit une forte diminution de l'incorporation des acides gras dans l'acide lysophosphatidique (Takeuchi and Reue, 2009). L'ensemble des données dont on dispose, laisse à penser que la GPAT3 et la GPAT1 représentent les principales enzymes impliquées dans la synthèse de l'acide lysophosphatidique (Figure 8).

- La 1-acylglycérol-3-phosphate O-acyltransférase (AGPAT) : elle a pour fonction d'ajouter un second acyl-CoA à l'acide lysophosphatidique, le convertissant en acide phosphatidique. Les deux principales isoformes dans le tissu adipeux humain sont AGPAT1 et 2 qui sont localisées au niveau du réticulum endoplasmique. L'invalidation d'AGPAT2 conduit à une lipodystrophie caractérisée par une absence de tissu adipeux à la naissance, une hypertriglycéridémie, une stéatose hépatique et une insulino-résistance sévère (Agarwal et al., 2002; Magre et al., 2003).

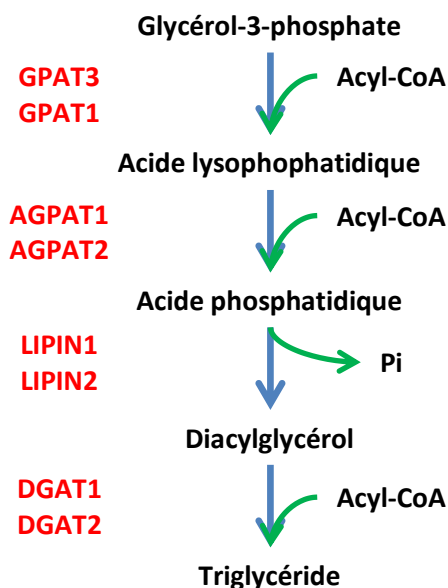


Figure 8 : La voie de synthèse des triglycérides dans les adipocytes.
Illustration d'après (Foufelle F et al., 2013)

- La phosphatidate phosphohydrolase qui est la phosphatase de l'acide phosphatidique. Cette activité est portée par une famille de protéine appelée lipine (Takeuchi and Reue, 2009). Les lipines sont cytoplasmiques et s'associent aussi au réticulum endoplasmique pour atteindre leur substrat qui est insoluble. La lipine 1 est la lipine la plus exprimée dans le tissu adipeux, et son invalidation chez la souris engendre une importante lipodystrophie et une stéatose hépatique (Peterfy et al., 2001). En revanche la surexpression de celle-ci engendre une augmentation importante du contenu en triglycéride dans le tissu adipeux chez la souris (Phan and Reue, 2005).
- La diacylglycérol acyltransférase (DGAT) : elle catalyse la dernière réaction de synthèse d'un triglycéride en estérifiant un troisième acyl-CoA sur la dernière position libre d'un diacylglycérol. Cette réaction se fait principalement dans le réticulum endoplasmique. On distingue deux DGAT produites par deux gènes non homologues chez l'Homme et la souris (Yen et al., 2008; Yu and Ginsberg, 2004). DGAT1 et DGAT2 sont toutes les deux fortement exprimées dans le tissu adipeux. On ignore encore si elles ont un rôle distinct dans la cellule, néanmoins, il apparaît que DGAT1 estérifie principalement les acides gras provenant de l'alimentation, alors que DGAT2 a comme substrat les acides gras provenant de la lipolyse (Yen et al., 2008) (Figure 8).

Une fois produits les triglycérides vont alors être stockés dans la gouttelette lipidique de l'adipocyte.

1.5.3 Biogenèse de la gouttelette lipidique

On sait peu de choses sur le mécanisme permettant la formation de la gouttelette de lipide de l'adipocyte. Néanmoins, des clichés obtenus par microscopie électronique tendent à montrer une forte proximité entre la membrane du réticulum endoplasmique et la gouttelette lipidique (Blanchette-Mackie et al., 1995). L'estérification des lipides se faisant majoritairement dans le réticulum endoplasmique, cela laisse à suggérer que les gouttelettes de lipides émanent directement du réticulum. Le modèle actuel sur la génération de la gouttelette lipidique a été proposé par l'équipe de Ploegh (Ploegh, 2007). Dans ce modèle, les triglycérides s'accumuleraient entre les deux feuilletts de la membrane du réticulum jusqu'à l'excision de la membrane. Les triglycérides seraient alors entourés par une partie de la membrane externe du

réticulum et par une partie de la membrane interne. Ce modèle, contrairement aux modèles précédents est en accord avec la présence des protéines transmembranaires (telles les

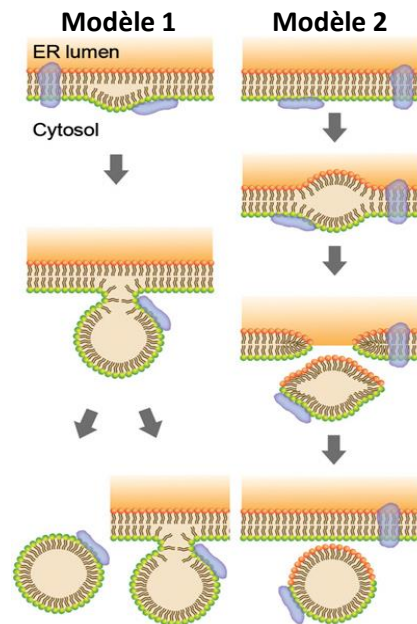


Figure 9 : Modèles de formation des gouttelettes lipidiques à partir du réticulum endoplasmique (RE). **Modèle 1** : les lipides se déposent entre les deux feuillets de la membrane du RE. Après avoir atteint une quantité critique, la gouttelette lipidique se forme à partir d'un seul feuillet de la membrane du RE. Par la suite, elle peut être libérée dans le cytosol ou rester attachée au RE. **Modèle 2** : la formation de la gouttelette est similaire au modèle 1, mais elle est excisée de la membrane du RE et les deux feuillets de la membrane du RE contribuent à la formation de la membrane mono-couche de la gouttelette lipidique. *Illustration d'après (Sepp D. Kohlwein 2012)*

molécules de CMH de classe I) ou des protéines du réticulum endoplasmique dont le domaine NH2 est intraluminal à la surface de la gouttelette lipidique. Cependant ce modèle soulève certaines questions, notamment sur les conséquences engendrées par la formation d'un pore dans la membrane du réticulum endoplasmique au moment de la libération de la gouttelette de lipide. Nous ne disposons à l'heure actuelle d'aucune preuve nous permettant de valider ou d'invalider ce modèle (Figure 9).

I.6 Lipolyse

À l'inverse de la lipogenèse, la lipolyse va permettre la dégradation des triglycérides en acide gras non estérifiés permettant, une fois libérés dans le sang, leur utilisation comme source d'énergie par les différents tissus de l'organisme.

L'hydrolyse des triglycérides intracellulaires va produire séquentiellement un diacylglycérol, un monoacylglycérol et un glycérol, permettant de libérer un acide gras non estérifié à chaque étape. Chacune de ces étapes est contrôlée par une lipase différente : la triglycéride lipase (ATGL), la lipase hormono-sensible (LHS) et la monoglycéride lipase (MGL). De plus, lors de la lipolyse, les gouttelettes lipidiques de l'adipocyte entreprennent une importante réorganisation structurelle impliquant des protéines associées aux gouttelettes lipidiques (périlipines), des lipases (ATGL et LHS) et divers cofacteurs (CGI-58/ABHD5)

I.6.1 Lipase hormono-sensible

In vitro, la LHS catalyse l'hydrolyse des triglycérides en diglycérides et des diglycérides en monoglycérides. Contrairement aux autres lipases des triglycérides connues chez les mammifères, la LHS est activée par phosphorylation réversible des résidus sérine par la PKA et inhibé par phosphorylation de la protéine kinase stimulée par l'AMP (AMPK) (Bezaire and Langin, 2009; Krintel et al., 2008). Une étape importante dans l'activation de la lipolyse est la translocation de la LHS du compartiment cytosolique à la surface de la gouttelette lipidique, ce qui est rendu possible par la phosphorylation de la PKA qui permet une augmentation de la surface hydrophobique de la LHS (Krintel et al., 2009).

I.6.2 Adipose triglycéride lipase

Les caractéristiques de cette lipase ont été décrites assez récemment (Zechner et al., 2009). Elle est une hydrolase lipidique à la typologie de repliement peu commune et qui diffère des autres lipases classiques. La région C-terminale de la protéine est essentielle pour sa localisation sur la gouttelette lipidique, et joue un rôle inhibiteur de l'activité catalytique en interférant avec le cofacteur CGI-58/ABHD5 (Schweiger et al., 2008). In vivo, il apparaît qu'ATGL est la lipase la plus importante du tissu adipeux blanc faisant de LHS la lipase principale des diglycérides (Zechner et al., 2009; Zimmermann et al., 2004) (Figure 10).

Les souris invalidées pour ATGL, montrent une forte diminution de la lipolyse dans les adipocytes et une obésité faisant rapidement son apparition (Haemmerle et al., 2006). Le métabolisme global de ces souris montre une incapacité à mobiliser les acides gras entraînant

une thermorégulation déficiente, une dépense énergétique réduite durant le jeûne et une lipolyse stimulée par l'exercice diminuée (Huijsman et al., 2009).

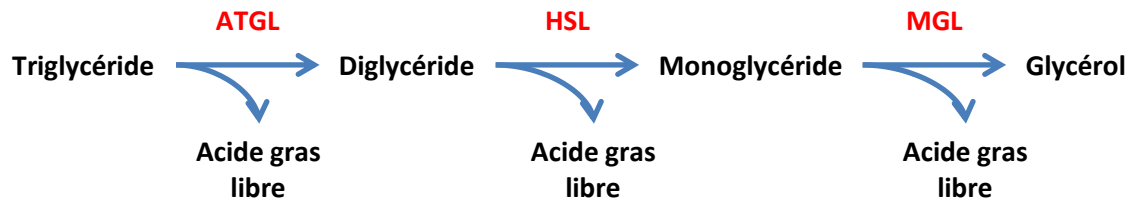


Figure 10 : Illustration schématique de la voie lipolytique. ATGL, HSL et MGL agissent en séquence ce qui entraîne la libération d'un acide gras à chaque étape

I.6.3 Monoglycéride lipase

La MGL est une sérine hydrolase qui est requise dans l'hydrolyse finale des monoglycérides produits par la LHS. La MGL hydrolyse les liaisons ester en position sn-1 (Lafontan and Berlan, 1993) et sn-2 des triglycérides sans préférence de position. La lipolyse est diminuée dans les modèles murins MGL^{-/-}, mais elle est compensée partiellement par une faible activité de la LHS sur les monoglycérides (Taschler et al., 2011) (Figure 10).

I.6.4 Protéines associées aux lipases

La lipolyse est un mécanisme finement régulé. En dehors des lipases, d'autres protéines sont essentielles à ce mécanisme et permettent de faire un lien entre les lipases et les tryglycérides accumulés dans la gouttelette lipidique.

I.6.4.1 Adipocyte protein 2 (aP2)/FABP4

aP2, aussi appelée FABP4 est la protéine la plus fortement exprimée par l'adipocyte. Elle est impliquée dans le trafic intracellulaire des acides gras et va agir comme une chaperonne facilitant leur captation et la lipolyse (Furuhashi and Hotamisligil, 2008). Lorsque LHS est phosphorylée par la PKA et qu'aP2 est lié à un acide gras, LHS et aP2 vont former un complexe moléculaire qui sera transloqué du cytoplasme vers la gouttelette lipidique (Smith et al., 2007). Les souris aP2^{-/-} ont des capacités lipolytiques réduites (Coe et al., 1999; Scheja et al., 1999), faisant d'aP2 une cible thérapeutique potentielle pour le traitement du diabète de type 2 (Furuhashi et al., 2008).

I.6.4.2 ABDH5/CGI-58

ABDH5 est un activateur spécifique de l'ATGL (Lass et al., 2006). Dans les adipocytes dont la lipolyse n'est pas stimulée, ABDH5 se lie aux gouttelettes lipidiques par son interaction avec la périlipine. Lors de l'activation de la lipolyse, ABDH5 se dissocie de la périlipine, interagit avec l'ATGL permettant l'activation de l'hydrolyse des triglycérides (Miyoshi et al., 2007; Yamaguchi et al., 2007).

I.6.4.3 Périlipines

Les périlipines sont des protéines fortement exprimées dans les adipocytes, et qui vont recouvrir la gouttelette lipidique. On les retrouve dans les autres types cellulaires qui stockent et qui utilisent des lipides comme les hépatocytes, ou les autres types d'adipocytes. La périlipine A est l'isoforme majoritaire des adipocytes, et est phosphorylée lors de l'activation du processus lipolytique. La phosphorylation de la périlipine libère ABDH5 permettant la formation du complexe ABDH5/ATGL ce qui enclenche le processus de lipolyse (Granneman et al., 2009). Néanmoins, les mécanismes précis de cette étape restent inconnus. On observe une chute très importante de la lipolyse dans les souris dont l'expression de la périlipine A a été invalidée (Girousse and Langin, 2012).

II. Tissu adipeux et fonction endocrines

Comme nous l'avons dit plus tôt, le tissu adipeux ne se résume pas aux fonctions de stockage que nous venons de présenter. En plus de celles-ci, les adipocytes et les cellules de la SVF sont une source de nombreuses molécules sécrétées que l'on appelle des adipokines et qui vont agir suivant un mode autocrine, paracrine ou endocrine. Il a été estimé que le tissu adipeux libère plus d'un millier de molécules différentes. Néanmoins, certaines adipokines sont majoritairement produites par les adipocytes, tandis que d'autres sont préférentiellement libérées par les cellules de la SVF comme les macrophages. De plus, bien que les adipokines soient considérées comme des molécules sécrétées uniquement par le tissu adipeux, nous savons aujourd'hui que ce n'est pas le cas et que la grande majorité des adipokines sont également produites dans d'autres tissus. Il est alors important de déterminer la contribution du

tissu adipeux dans l'expression de chaque adipokine. Nous décrivons dans ce chapitre les adipokines sécrétées principalement par les adipocytes comme la leptine et l'adiponectine.

II.1 La leptine

En 1949, l'équipe de George Davis Snell du Jackson Memorial Laboratory décrit un modèle de souris génétiquement obèse, la souris ob/ob. Ces souris sont caractérisées par une obésité, une hyperphagie, un diabète, une infertilité, une activité physique réduite et une

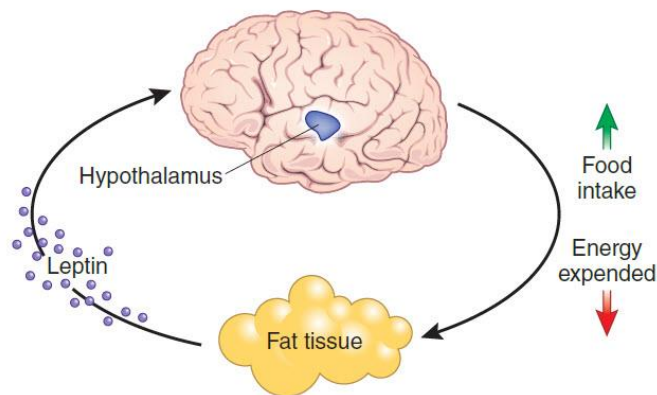


Figure 11 : Leptine et régulation de la balance énergétique. La leptine dans le sang agit au niveau du cerveau pour réguler la prise alimentaire. *Illustration d'après Jeffrey M Friedman, 2010*

dérégulation de la thermorégulation. À cette époque, le gène porteur de cette mutation n'est pas encore identifié. Il faudra attendre 1994 pour que Friedman et son équipe identifient ce gène et la protéine pour laquelle il code qu'il nommera leptine (qui vient du grec *leptos* qui veut dire mince) (Zhang et al., 1994). Dès l'année suivante un nombre important d'études mit en évidence que l'injection quotidienne de leptine à des souris ob/ob réduit rapidement la prise alimentaire, réduit le pourcentage de masse grasse, et maintient la masse musculaire. De plus on observe un retour à une glycémie normale ainsi qu'à une augmentation de la dépense d'énergie (Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995). Du fait de ses effets sur le comportement alimentaire, on l'appelle parfois « l'hormone de la satiété » (Figure 11).

Il existe une corrélation linéaire positive entre le niveau de leptine plasmatique et le pourcentage de tissu adipeux d'un individu. Ainsi la quantité moyenne de leptine sécrétée par gramme de tissu adipeux est deux fois plus importante chez un sujet obèse que chez un sujet mince. La sécrétion de leptine par le tissu adipeux se fait également de façon circadienne, ou

l'on observe un pic de sécrétion entre 23h00 et 01h00. Cette périodicité dans la production de leptine peut être due à la capacité du tissu adipeux à en stocker une quantité importante avant de la relarguer.

Le récepteur de la leptine, Ob-R, aussi appelé LEP-R ou CD295, a été isolé dans le plexus choroïde du cerveau de la souris. Il code pour cinq isoformes dont Ob-Rb est la forme longue du récepteur possédant un domaine cytoplasmique important nécessaire à la transmission du signal. Ob-Rb va constituer entre 30 et 40% des récepteurs de la leptine dans le cerveau et plus précisément au niveau du noyau arqué hypothalamique ventromédian et dorsomédian qui sont décrits comme les zones impliquées dans la régulation de la satiété. Ob-R et ses transcrits alternatifs vont, une fois activés, interagir avec la tyrosine kinase JAK et son effecteur STAT.

Enfin, la signalisation de la leptine ne se limite pas à l'hypothalamus, puisqu'un grand nombre de tissu exprime des récepteurs de la leptine. Elle va ainsi agir directement sur le tissu musculaire squelettique et augmenter l'oxydation des acides gras en activant l'AMPK (Garcia-Carrizo et al., 2015).

II.2 L'adiponectine

En 1996, le groupe de Spiegelman isole chez la souris l'ADNc d'une nouvelle molécule du tissu adipeux qu'ils appellent adipoQ (Hu et al., 1996). Ils montrent que l'expression de cette protéine est spécifique du tissu adipeux, mais qu'elle diminue lors de l'obésité. La même année, cette protéine a été identifiée chez l'homme sous le nom de GBP 28 par le groupe de Nakano (Nakano et al., 1996). Cette même protéine décrite sous différents noms dans différentes espèces est aujourd'hui reconnue sous le nom d'adiponectine. Elle est constituée de 244 acides aminés chez l'Homme ou elle est fortement sécrétée puisqu'on la retrouve dans des conditions physiologiques normales à une concentration plasmatique comprise entre 5 et 30 mg/L. À titre de comparaison la concentration de leptine circulante est comprise entre 2 et 8 µg/L. Cependant, des travaux récents ont montré que d'autres types cellulaires comme les cardiomyocytes, les cellules musculaires striées, les ostéoblastes, les cellules du placenta, les cellules endothéliales ou les cellules pituitaires pouvaient produire de l'adiponectine.

Deux récepteurs de l'adiponectine ont été identifiés : AdipoR1 que l'on retrouve de façon ubiquitaire, mais principalement au niveau musculaire et AdipoR2 exprimé fortement dans le foie (Kadowaki et al., 2006; Yamauchi et al., 2003).

L'adiponectine a un effet insulinosensibilisant, de par son action sur les muscles squelettiques et sur le foie stimulant l'oxydation des acides gras. De plus elle inhibe la gluconéogenèse hépatique en activant l'AMPK. En accord avec ces données physiologiques, de nombreuses études ont montré l'existence d'une relation inverse entre les concentrations d'adiponectine circulantes et la résistance à l'insuline dans des pathologies comme l'obésité et le diabète de type 2 (Antuna-Puente et al., 2008; Bastard et al., 2006).

En plus de ses effets sur la sensibilité à l'insuline, l'adiponectine possède des effets anti-inflammatoires qui passeraient par une régulation du recrutement des macrophages au niveau des sites inflammatoires (Ouedraogo et al., 2006). Des études *in vitro* ont pu montrer que l'adiponectine pouvait diminuer la réponse inflammatoire engendrée par le TNF α (Ouedraogo et al., 2006). Ces études sont en accord avec le fait que l'adiponectine diminue les effets néfastes de l'hyperglycémie et l'effet des cytokines pro-inflammatoire au niveau endothélial (Goldstein et al., 2009). On observe ainsi chez les patients ayant une adiponectinémie basse un risque important d'athérosclérose (Ouedraogo et al., 2007), ce que l'on observe également dans les souris *adipoq*^{-/-} ou de nombreux problèmes vasculaires sont rapportés.

Il est connu que l'AMPK contrôle la physiologie rénale. Ainsi, comme cette enzyme est activée par l'adiponectine, on observe une corrélation entre l'adiponectinémie et l'albuminurie (Komaba et al., 2006; Lenghel et al., 2012). En effet, les souris invalidées pour le gène de l'adiponectine montrent une albuminurie augmentée, associée à des anomalies cellulaires rénales caractérisées par une fusion des pieds des podocytes. L'administration d'adiponectine chez ces souris conduit à une normalisation de l'albuminurie et à un effacement des pieds des podocytes (Sharma et al., 2008).

Enfin, de nombreuses études récentes tendent à montrer un lien entre le niveau d'adiponectine et l'évolution de certains cancers. Ainsi il a été observé que chez la femme ménopausée, une faible adiponectinémie est associée un risque accru de cancer du sein (Korner

et al., 2007; Wang et al., 2006). Les femmes dont l'indice de masse corporel est élevé et dont le taux plasmatique d'adiponectine est faible ont un risque 6,5 fois supérieur de développer un cancer de l'endomètre (Cust et al., 2007; Dal Maso et al., 2004). Chez l'homme, Le niveau d'adiponectine corrèle négativement avec le risque de cancer colorectal et de la prostate (Guadagni et al., 2009; Wei et al., 2005). En dehors de ces corrélations, les mécanismes corrélant l'adiponectine et le cancer sont à l'heure actuelle toujours débattus. Les effets de l'adiponectine sur les lignées de cellules cancéreuses sont contradictoires. Certains travaux montrent un effet antiprolifératif (Wang et al., 2006) et d'autres un effet hyper-prolifératif (Lang and Ratke, 2009) et les liens entre ces études reste très difficile à établir du fait des conditions expérimentales différentes. Quelques études suggèrent néanmoins que les effets anti-prolifératif observés soient imputés à l'activation de l'AMPK qui est un régulateur important de p21 et p53 (Luo et al., 2005), deux protéines impliquées dans le contrôle de la croissance cellulaire. Néanmoins, certaines études semblent montrer qu'elle favoriserait la dispersion métastatique des cellules tumorales (Chiu et al., 2009).

En conclusion, malgré la quantité relativement importante de données dont nous disposons aujourd'hui sur l'adiponectine, ses effets pléiotropes dans différents organes, ainsi que dans différentes pathologies rendent complexe son intégration dans un schéma physiologique simple (Figure 12).

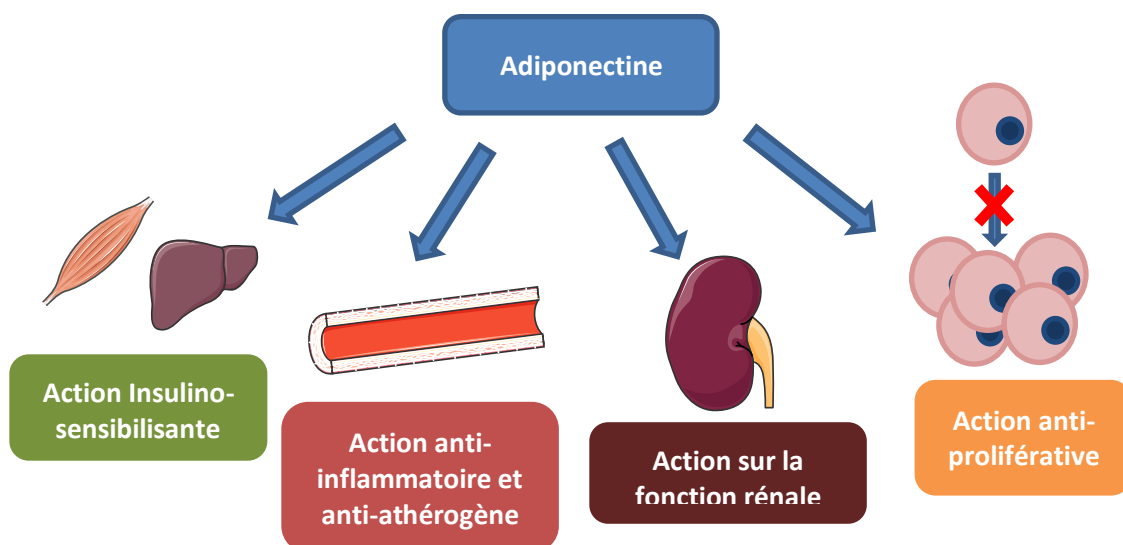


Figure 12 : Pléiotropie fonctionnelle de l'adiponectine

III. Le progéniteur adipeux

Le développement du tissu adipeux au cours de la croissance ou dans des conditions pathologiques se fait par une augmentation de sa taille ainsi que du nombre de cellules qui le compose. Les adipocytes sont toutefois des cellules totalement dépourvues de capacité de prolifération. Leur nombre au sein du tissu adipeux est régulé par un pool de progéniteurs adipeux, dont nous avons parfois parlé dans les parties précédentes, et qui sont présents tout au long de la vie adulte (Hauner et al., 1989; Spalding et al., 2008). Dans la suite de ce manuscrit, nous essaierons de décrire leurs rôles caractéristiques au cours du développement du tissu adipeux.

III.1 Identification du progéniteur adipeux

On sait aujourd'hui que les progéniteurs adipeux se trouvent dans la fraction stromale vasculaire (SVF) du tissu adipeux (Zuk et al., 2002). La SVF représente toutes les cellules du tissu adipeux qui ne sont pas des adipocytes, et dont les progéniteurs adipeux représentent une sous population. Celle-ci est obtenue par une digestion à la collagénase du tissu suivie d'une centrifugation lente permettant de séparer les cellules de la SVF qui vont sédimenter, et les adipocytes vont se retrouver dans le surnageant du fait de leur densité. Une fois récupérée, la SVF est mise en culture *ex vivo* ce qui permet de séparer les cellules capables de se différencier en adipocyte, des cellules sanguines, des cellules endothéliales et des autres types cellulaires non-fibroblastiques qui ne sont pas capables d'adhérer au plastique de la boîte de culture. La quasi-totalité des cellules adhérentes sont dotées d'une capacité de différenciation adipocytaire suite à une stimulation avec un cocktail hormonal composé généralement d'insuline, d'un glucocorticoïde, d'un inhibiteur de la phosphodiesterase et très souvent d'un agoniste de PPAR γ (facteur de transcription important pour la différenciation adipocytaire, sur lequel nous reviendrons plus tard). La purification des cellules capables de se différencier dans la SVF ne permet pourtant pas l'identification exacte du type cellulaire du progéniteur adipeux *in vivo*. Ainsi, un nombre important d'études essaie de l'isoler par des stratégies de cytométrie en flux. La plupart de ces études ont pu montrer que les marqueurs propres aux cellules souches mésenchymateuses comme CD34 et Sca-1 sont fortement enrichis dans les progéniteurs adipeux (Cawthorn et al., 2012). On a ainsi pu déterminer que les cellules CD45⁻ ; CD31⁻ ; Ter119⁻

; CD29⁺ ; CD34⁺ ; Sca-1⁺ avaient un phénotype différent suivant leur expression du marqueur CD24. Bien que les cellules CD24⁺ et CD24⁻ soient capables de se différencier en adipocyte *ex vivo*, seules les cellules CD24⁺ sont capables, une fois transplantées dans un microenvironnement approprié de reconstituer un coussinet adipeux fonctionnel chez une souris lipodystrophique (Rodeheffer et al., 2008).

III.2 Origines embryonnaires du progéniteur adipeux

Les adipocytes se développent à partir du mésenchyme, d'origine mésodermique. Au cours du développement du coussinet adipeux, la première structure que l'on voit apparaître est un amas de vaisseaux sanguin appelé organe primitif, et qui est présent chez différentes espèces : humain, souris, poulet, reptile (Wassermann, 1965). Cette observation confirme comme on le pense depuis longtemps qu'il y a un lien étroit entre l'adipogenèse et l'angiogenèse (Cinti et al., 1984; Fukumura et al., 2003). Plusieurs études soutiennent fortement cette idée en montrant que les progéniteurs adipeux du coussinet adipeux de très jeunes souris sont associés physiquement avec les parois des vaisseaux sanguins intra-adipeux. De plus le récepteur du PDGF (CD140) qui est utilisé dans ces études pour marquer les cellules des parois des vaisseaux sanguins peut être utilisé pour enrichir, suite à un tri, les cellules possédant un potentiel adipogénique. Ces études montrent que les progéniteurs adipeux sont PDGFR β ⁺, mais que toutes les cellules PDGFR β ⁺ ne disposent pas d'un potentiel adipogénique (Tang et al., 2008). De manière contradictoire, une étude similaire n'a pas réussi à confirmer ces résultats, mais identifie un progéniteur commun PDGFR α ⁺ pour tous les adipocytes blancs et qui se distinguent des cellules PDGFR α ⁺ retrouvées dans les parois des vaisseaux (Berry and Rodeheffer, 2013). Cette proximité entre angiogenèse et adipogenèse a fait que McCullough en 1944 suggère que les adipocytes dérivent directement des progéniteurs hématopoïétiques (McCullough, 1944). Certaines études vont aujourd'hui dans ce sens notamment au niveau de la moelle osseuse (Majka et al., 2010), d'autres ne le confirment pas (Berry and Rodeheffer, 2013; Koh et al., 2007), ce qui n'exclut pas l'hypothèse que de rares dépôts adipeux pourraient dériver directement de lignées hématopoïétiques. Cependant, dans la région céphalique, le mésenchyme dérive directement du neuroectoderme, donnant à une partie des adipocytes de l'organisme une origine neuroectodermique (Billon et al., 2007).

L'origine des progéniteurs adipeux est très certainement dans le domaine du tissu adipeux, une question sur laquelle la science peine à apporter des réponses claires. Bien que de nombreuses informations aient été obtenues, il reste difficile de concilier toutes ces données de manière cohérente. Ces difficultés peuvent provenir du fait des conditions expérimentales différentes de chacune de ces études, ainsi que du modèle cellulaire ou de la lignée de souris employée. Cette hétérogénéité dans les résultats obtenus peut être alors expliquée par l'extraordinaire plasticité de ce type cellulaire.

III.3 Cellules hMADS

Un certains nombres de travaux ont été réalisés au laboratoire afin de déterminer les facteurs pouvant influencer sur la prolifération, ainsi que sur l'auto-renouvellement des progéniteurs adipeux humains. L'identification de ces régulateurs passait tout d'abord par l'isolement de ces progéniteurs à partir du tissu adipeux de jeunes donneurs. Ces cellules ont été nommées hMADS (human multipotent adipose derived stem cells)

III.4 Isolement des cellules progénitrices à partir de tissu adipeux blanc

Afin d'isoler les progéniteurs adipeux, les échantillons de tissu adipeux chez l'Homme peuvent être isolés à partir de lipectomies ou principalement par lipoaspiration. On désigne les cellules isolées de la SVF ayant un potentiel de différenciation par différents termes comme ASCs (Adipose-derived Stem/Stromal Cells), ADAS (Adipose-Derived Adult Stem), ADSCs (adipose-derived Stromal Cells) ou AdMSCs (Adipose Mesenchymal Stem Cells). Il a été établi comme consensus l'utilisation de terme ASCs pour « Adipose-derived Stem Cells » pour les populations de cellules multipotentes issues de la SVF et adhérentes au plastique.

Afin d'obtenir un modèle d'ASCs, le laboratoire a effectué une digestion à la collagénase de tissu adipeux de jeunes donneur. Une fois la fraction adipocytaire éliminée, la SVF a étéensemencée dans des boîtes de pétri à une densité comprise entre 1000 et 3500 cellules en présence de milieu DMEM 1g/l de glucose complémenté à 10% en sérum de veau fœtal. Seules les cellules adhérant rapidement ont été retenues par le laboratoire dans l'établissement du modèle et dénommées hMADS. Les propriétés suivantes des hMADS sont les suivantes :

- Nombre de doublements de population élevé sans signe majeur de sénescence ou de transformation
- Caryotype euploïde à 2n chromosomes
- profil de marqueurs de surface comparable à celui des cellules souches mésenchymateuses tels que : CD105⁺ ; CD90⁺ ; CD34⁻, leur profil est complété par d'autres marqueurs tel que : CD44⁺ ; CD49b⁺ ; CD13⁺ ; Stro-1⁻ ; CD15⁻ ; CD117⁻ ; Flk-1⁻ ; gly-A⁻ ; CD133⁻ ; HLA-DR⁻ et HLA-I^{low}
- Elles possèdent une activité télomérase
- *In vitro*, les hMADS ont montré une capacité importante à se différencier en adipocyte en absence de sérum, en ostéoblaste et en chondrocyte (Rodriguez et al., 2005; Zaragosi et al., 2006)
- *In vivo*, après culture dans un substitut osseux synthétique en milieu de différenciation ostéoblastique pendant trois jours puis transplantation sous-cutanée chez la souris nude, les hMADS forment de l'os minéralisé ectopique après quatre semaines. La transplantation directe d'hMADS dans le muscle de souris *mdx*, déficiente pour la dystrophine, permet la génération *de novo* de fibres musculaires exprimant la dystrophine humaine (Rodriguez et al., 2005)



Figure 13 : (A) Différenciation adipocytaire de cellules hMADS pendant 14 jours. Les cellules qui ont accumulé des triglycérides sont marquées en rouge à l'Oil Red-O. (B) Différenciation ostéoblastique des cellules hMADS après 24 jours, les cellules sont marquées à l'alizarine, colorant spécifique de la matrice calcifiée. Illustration d'après A-M Rodriguez et al, 2003 et C. Elabd et al, 2007

L'ensemble de ces données font de ces cellules un modèle de cellules souches mésenchymateuses (Rodriguez et al., 2005).

III.5 Prolifération et potentiel de différenciation des progéniteurs adipeux

Très peu de données ont été collectées concernant la prolifération et l'auto-renouveau de ces cellules *in vivo*, l'absence de marqueur spécifique rendant impossible leur suivi au sein du tissu. L'ensemble des données dont nous disposons proviennent des travaux réalisés *in vitro*. Les précédents travaux du laboratoire ont pu montrer que la morphologie des cellules hMADS change en fonction de leur temps de passage *in vitro*. Ce changement morphologique est accompagné d'une diminution dans le temps de doublement de ces cellules. En effet, le temps de doublement est de deux jours pour des cellules qui sont au passage 15, et il passe à 4 jours pour des cellules à passage 20, de plus il apparaît que cette perte du potentiel de prolifération s'accompagne d'une perte du potentiel de différenciation. Le laboratoire a montré que le fibroblaste growth factor 2 (FGF2) jouait un rôle important dans le contrôle de ce potentiel. En effet, l'augmentation du temps de doublement est concomitante avec la perte de sécrétion du FGF2 par les hMADS. Le FGF2 sécrété agit par effet autocrine/paracrine afin de maintenir le potentiel de prolifération et de différenciation des cellules. Ces données sont renforcées par l'ajout de FGF2 dans les cultures qui permet de stimuler le potentiel de prolifération et maintenir le potentiel de différenciation (Zaragosi et al., 2006).

L'activine A, membre de la famille des TGF β (transforming growth factor), est également sécrété par les cellules hMADS et son expression diminue fortement pendant l'adipogenèse. L'ajout d'activine A engendre une augmentation de la prolifération et une diminution de la différenciation alors que son inhibition a pour effet de diminuer la prolifération et de favoriser la différenciation. Les effets de l'activine A sont transmis par la voie Smad2 et le facteur de transcription CEBP β (Zaragosi et al., 2010). Le BMP4, de la même famille que l'activine A et activant aussi la voie Smad2, a un effet dose-dépendant sur la prolifération des hASCs (Vicente Lopez et al., 2011). La voie Smad2 semble donc être une voie importante dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs adipeux. *In vivo*, il a été proposé que les macrophages résident dans le tissu adipeux aient un effet sur l'homéostasie du tissu,

notamment par leur sécrétion de TNF α (tumor necrosis factor) qui a été décrit *in vitro* par le laboratoire pour stimuler l'expression du FGF2 et de l'activine A (Zaragosi et al., 2010).

IV. La différenciation adipocytaire

Il est communément admis, que la différenciation adipocytaire se fait en deux phases : une première phase de détermination adipocytaire et une seconde phase de différenciation adipocytaire terminale (Figure 14). Bien que la différenciation adipocytaire terminale soit largement décrite dans de nombreux modèles et espèces, les données disponibles concernant la détermination sont quant à elles très peu nombreuses et relèvent bien souvent plus de l'hypothèse que de la réalité.

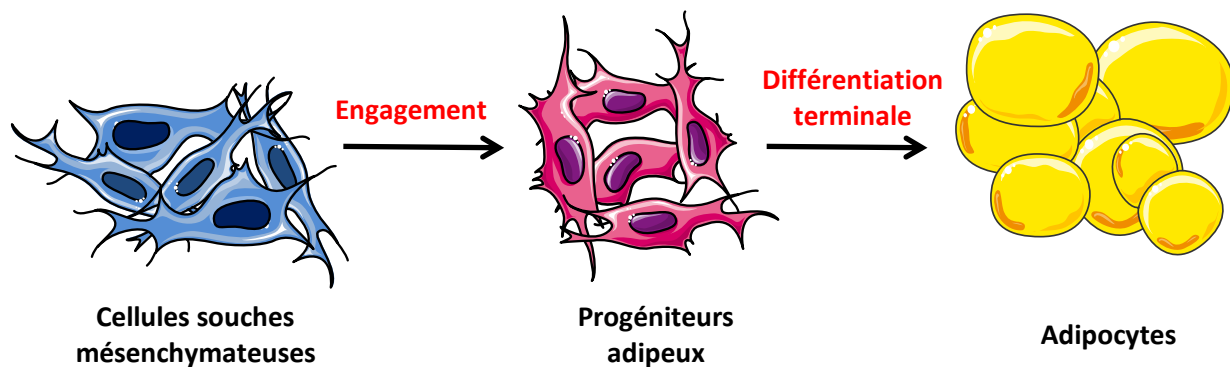


Figure 14 : Schéma des principales étapes de l'adipogenèse.

IV.1 La détermination adipocytaire

Lors de la première phase, appelée étape de détermination adipocytaire, la cellule souche mésenchymateuse présente dans le tissu adipeux va perdre sa plasticité pour donner le progéniteur adipeux unipotent. Le peu de connaissances dont on dispose sur cette étape s'explique par le fait que le progéniteur adipeux reste à l'heure actuelle une cellule hypothétique et n'a jamais été observée *in vitro* ou *in vivo*, ce qui rend l'étude de ce processus complexe du fait que l'on ignore sur quoi il aboutit. De plus, les modèles d'études les plus connus et les plus utilisés de l'adipogenèse comme les 3T3-L1, ou les 3T3-F442A font déjà partie du lignage adipocytaire, les rendant inutilisables pour l'étude de cette étape. Ces modèles, bien que dotés d'une capacité de différenciation en adipocytes ne sont pas représentatifs des progéniteurs adipeux que l'on s'attend à retrouver au sein du tissu adipeux. Enfin il faut avoir

conscience du fait que la plupart des études sur l'adipogenèse ont été obtenues *in vitro*, et que nous disposons de très peu de données *in vivo*.

Néanmoins, plusieurs études ont mis en avant certaines voies de signalisation permettant d'engager les cellules souches mésenchymateuses vers la voie adipogénique ou ostéoblastique. Ainsi, la voie Hedgehog et la voie Wnt canonique sont pro-ostéogéniques et anti-adipogéniques (Rosen and MacDougald, 2006). Ces deux voies de signalisation ont comme point commun d'agir sur COUP-TFII, un facteur de transcription connu pour être un inhibiteur des facteurs de transcription pro-adipogénique comme PPAR γ et C/EBP α . De la même manière, la voie de l'insuline est fortement adipogénique. En revanche le rôle de nombreuses voies dans la balance entre adipogenèse et ostéogenèse reste à déterminer. C'est le cas de l'ensemble des facteurs activant la voie Smad3 comme le TGF β et la famille des BMP (bone morphogenetic protein). En effet, BMP2 et BMP4 semblent, à la fois stimuler l'adipogenèse et l'ostéogenèse. D'autres facteurs comme les activines, et les FGF ont montré des effets très disparates sur l'adipogenèse (Dani, 2013).

IV.2 La différenciation adipocytaire terminale

Cette étape permet d'aboutir à un adipocyte mature et fonctionnel. Elle a été largement étudiée, à partir des années 1974 après la découverte des premiers modèles cellulaires ayant une capacité de différenciation en adipocytes. *In vitro*, l'ajout d'un cocktail hormonal, inducteur de la différenciation adipocytaire, va conduire à l'activation de multiples facteurs de transcription pro-adipogéniques et à la répression de ceux anti-adipogéniques. Deux familles de protéines jouent un rôle important dans l'induction de l'adipogenèse : les PPARs (peroxisome proliferator activated receptors) et la famille des C/EBP (CAAT/enhancer-binding proteins).

IV.2.1 PPAR

Les PPAR font partie de la sous famille des récepteurs hormonaux nucléaires, identifiés comme faisant partie des récepteurs dont l'activité transcriptionnelle est modulée par des interactions ligand-récepteur. Les trois membres connus de la famille PPAR (PPAR α , PPAR γ et PPAR δ) se fixent sur la même séquence de type DR-1 suggérant qu'ils régulent les mêmes gènes. Bien que l'expression de PPAR α et PPAR δ ne soit pas restreinte au tissu adipeux, elles

sont toutes les deux impliquées dans la différenciation. L'expression ectopique de chacune de ces trois isoformes a permis de démontrer que PPAR α et, avec une plus grande efficacité, PPAR γ sont capables d'induire l'adipogenèse. De son côté, PPAR δ ne semble pas suffisant pour induire le programme de différenciation adipocytaire.

IV.2.2 PPAR γ

Le gène de PPAR γ code pour deux transcrits produits par épissage alternatif qui diffèrent en C-term : PPAR γ 1 et PPAR γ 2 (Zhu et al., 1995) (Figure 15). On retrouve PPAR γ 1 exprimé à faible niveau dans différents tissus, alors que PPAR γ 2 est retrouvé à faible niveau dans les lignées de progéniteur adipeux et fortement détecté dans le tissu adipeux, dont il est spécifique (Zhu et al., 1995).

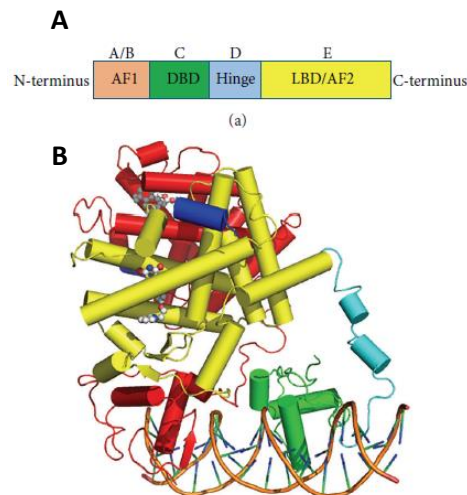


Figure 15 : Organisation des domaines de PPAR γ . **(A)** Structure primaire de PPAR γ . **(B)** Structure obtenue par cristallographie de l'hétérodimère PPAR γ -RXR fixé au domaine PPRE de l'ADN avec un ligand agoniste de l'acide rétinoïque et la rosiglitazone. Les protéines et l'ADN sont montrés en rubans, alors que les sphères représentent les ligands. RXR est coloré en rouge, le domaine de la fixation au ligand de PPAR γ est coloré en jaune, le domaine de fixation à l'ADN de PPAR γ est coloré en vert. Le domaine charnière de PPAR γ est coloré en cyan et le co-activateur NCOA2 (nuclear receptor coactivator 2) est coloré en bleu. PDB: 3DzY. *Illustration d'après (Alice J. Kroker et al, 2015)*

L'ensemble des données *in vivo* et *in vitro* dont on dispose aujourd'hui sur PPAR γ en fait le principal régulateur de la différenciation adipocytaire. Spiegelman et ses collaborateurs ont montré il y a plusieurs années qu'au cours de l'adipogenèse PPAR γ active la transcription de ses gènes cibles en formant un hétérodimère avec RXR (récepteur X des rétinoïdes) (Tontonoz et al., 1994a; Tontonoz et al., 1994b). Le complexe va alors se fixer sur une séquence spécifique de

l'ADN appelée PPRE (peroxisom proliferator response element) (Desvergne and Wahli, 1999). Des expériences de gain de fonction de PPAR γ dans des fibroblastes de souris ne faisant pas partie du lignage adipocytaire, ont été réalisées. Ces travaux ont pu montrer que PPAR γ seul peut induire le programme adipogénique dans ces cellules donnant lieu à des cellules possédant de nombreuses caractéristiques des adipocytes (Tontonoz et al., 1994c). L'importance de PPAR γ est confirmée dans les modèles de souris KD (Knockdown) pour PPAR γ qui montrent une importante lipodystrophie (Koutnikova et al., 2003). Le processus de transcription de PPAR γ , va par l'utilisation de promoteurs alternatifs, générer quatre transcrits de PPAR γ . PPAR γ 1, 2 et 3 codent pour le même polypeptide, alors que la séquence de PPAR γ 2, comporte trente acides aminés supplémentaires en N-term (Fajas et al., 1997; Meirhaeghe et al., 2003; Tontonoz et al., 1994b). L'expression de PPAR γ 1 ne se limite pas au tissu adipeux, contrairement à PPAR γ 2 dont l'expression y est fortement restreinte. Néanmoins l'expression ectopique de PPAR γ 1 dans des fibroblastes embryonnaires de souris PPAR γ ^{-/-} permet d'induire l'adipogenèse démontrant que PPAR γ 1, possède les mêmes propriétés que PPAR γ 2 (Mueller et al., 2002). De plus, les souris invalidées pour PPAR γ 2 présentent une insensibilité à l'insuline et une diminution de tissu adipeux, mais pas de perte des dépôts adipeux, ce qui suggère que PPAR γ 1 peut compenser un certain nombre de fonction de PPAR γ 2 (Zhang et al., 2004a), mais pas toute puisque PPAR γ 2 semble avoir un rôle dans la sensibilité des adipocytes à l'insuline, fonction que PPAR γ 1 ne semble pas restaurer.

PPAR γ contrôle aussi l'expression d'un grand nombre de gènes important pour la fonction adipocytaire (Tontonoz et al., 1994b; Tontonoz et al., 1994c).

IV.2.3 C/EBP α

C/EBP α est également un régulateur clef de la différenciation adipocytaire. Diverses études *in vitro* ont pu montrer que C/EBP α provoquait une différenciation adipocytaire dans différents modèles de fibroblastes (Freytag et al., 1994). L'obtention de modèles de souris invalidées pour ce facteur de transcription a permis de montrer son importance dans le développement du tissu adipeux blanc (Wang et al., 1995).

IV.2.4 PPAR γ et C/EBP α

Quelques années après la découverte de l'importance de PPAR γ lors de l'adipogenèse, l'équipe de Spiegelman a pu montrer que C/EBP α et PPAR γ font partie d'une seule et même voie de signalisation lors de l'adipogenèse dans lequel PPAR γ est le facteur dominant (Rosen et al., 2002). En effet, PPAR γ induit la différenciation adipocytaire des fibroblastes embryonnaires de souris invalidés pour C/EBP α , alors que C/EBP α échoue à induire le programme adipogénique dans des fibroblastes embryonnaires de souris invalidés pour PPAR γ .

IV.2.5 C/EBP β et C/EBP δ

On sait aujourd'hui que l'activation de PPAR γ et C/EBP α se fait suite à une cascade d'expression de différents facteurs de transcription. Ainsi, deux autres membres de la famille des C/EBP : C/EBP β et C/EBP δ s'expriment en amont de C/EBP α , et sont responsables de son expression (Cao et al., 1991; Yeh et al., 1995). L'expression de ces deux facteurs de transcription peut induire la différenciation adipocytaire des cellules 3T3-L1 en absence de cocktail hormonal de différenciation et dans des fibroblastes non adipogéniques NIH-3T3. En 1997, l'identification des séquences de régulations spécifiques des C/EBP dans les promoteurs de C/EBP α et PPAR γ confirme l'importance de C/EBP β et C/EBP δ dans l'expression de C/EBP α et PPAR γ (Christy et al., 1991; Clarke et al., 1997) (Figure 16). En 1997, les travaux de Tanaka ont montré que les souris déficientes à la fois en C/EBP β et C/EBP δ ont un développement du tissu adipeux très faible, néanmoins ce défaut de développement semble dû à une cause en aval de PPAR γ et C/EBP α puisque que ces deux facteurs de transcription sont exprimés dans le peu de tissu adipeux présent chez ces souris (Tanaka et al., 1997). En revanche, les fibroblastes embryonnaires obtenus de ces souris sont dénués de toute capacité de différenciation en culture. Ces données montrent qu'il existe un certain nombre de points communs dans les étapes précoces de l'adipogenèse entre les données obtenues *in vivo* et *in vitro*, où il semble que des mécanismes alternatifs assurent l'expression de PPAR γ et C/EBP α . En 2004 les études de Klemm et Lane ont permis de mettre en évidence que la protéine CREB (cAMP regulatory element-binding protein), qui est activée très précocement lors de la différenciation adipocytaire des cellules 3T3-L1, participe à l'induction de l'expression de C/EBP β (Zhang et al., 2004b) (Figure 16). Cette observation confirme les études précédentes, qui avaient mis en

évidence le rôle de la signalisation de l'AMPc dans le contrôle de l'expression de C/EBP β (Cao et al., 1991), expliquant ainsi pourquoi les milieux induisant la différenciation adipocytaire sont composés en parti d'un inducteur de la voie AMPc comme l'isobutylmethylxanthine. En revanche l'induction de C/EBP δ est facilitée par la voie des glucocorticoïdes et C/EBP β (Cao et al., 1991).

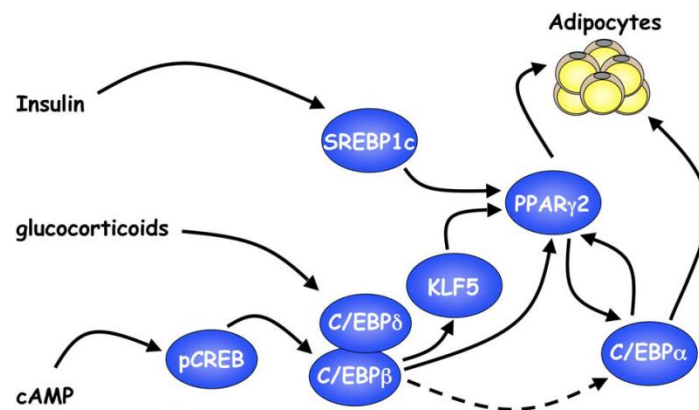


Figure 16 : Cascade des facteurs de transcription au cours de la différenciation adipocytaire. Illustration d'après (Stephen R. Farmer 2006).

IV.2.6 Les autres facteurs adipogéniques

Les facteurs de transcriptions dont nous venons de parler ne sont pas les seuls facteurs importants pour le programme adipogénique. L'arrivée des techniques à large échelle a permis de mettre en évidence que d'autres facteurs de transcriptions pouvant jouer un rôle important dans les étapes précoces de la différenciation adipocytaire (Fu et al., 2005; Soukas et al., 2001). Les investigations ont ainsi permis d'identifier Krox20 comme facteur agissant de façon très précoce au cours de la différenciation, et qui contribue à l'induction de C/EBP β et coopère avec celui-ci afin de faciliter la différenciation terminale (Chen et al., 2005). Plus récemment, des études montrent que le temps qui sépare l'apparition de C/EBP β , de l'expression de PPAR γ 2 vient du temps nécessaire à la synthèse de protéines additionnelles essentielles à l'activité de C/EBP β (Chen and Wang, 2005). Oishi et al ont pu montrer en 2005 que la transcription de KLF5 (Kruppel-like factor 5) est activée par C/EBP β et C/EBP δ , et que ces trois facteurs agissent en coopération pour assurer la transcription de PPAR γ 2 (Oishi et al., 2005). Les souris déficientes hétérozygotes pour KLF5 ont une déficience sérieuse en tissu adipeux. De plus, les fibroblastes obtenues de ces souris KLF5^{+/-} ne sont pas capables de se différencier *in vitro* (Li et al., 2005).

On sait aujourd'hui que d'autres facteurs sont induits très tôt au cours de l'adipogenèse et convergent vers PPAR γ en aval de C/EBP β et C/EBP δ . C'est le cas du facteur de transcription SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein 1c) à domaine HLH (Helix Loop Helix). En effet, ce facteur de transcription, dont nous avons parlé précédemment augmente fortement pendant la différenciation. Les expériences de surexpression menées par Kim et Spiegelman ont montré que ce facteur de transcription favorise significativement l'activité adipogénique de PPAR γ , alors que l'expression ectopique d'un dominant négatif de SREBP-1c inhibe la différenciation adipocytaire (Kim and Spiegelman, 1996). La surexpression de SREBP-1c seul déclenche une différenciation adipocytaire modérée, mais des études plus poussées ont permis de montrer qu'il contribue à la production d'un ligand de PPAR γ facilitant ainsi son activité (Kim et al., 1998a).

IV.2.7 Les modifications d'histones

Il est connu depuis plusieurs années que les histones acétyltransférases (HAT) et les histones déacétylase (HDAC) influencent l'activité des facteurs de transcriptions pro-adipogéniques. En effet, le recrutement sélectif de différentes HAT et HDAC permet à PPAR γ d'avoir des effets variables sur divers promoteurs (Guan et al., 2005). Plus récemment, des méthyltransférases ont aussi été impliquées dans la régulation de l'adipogenèse. C'est le cas de la PTIP β (Pax-transactivation-domain-interacting protein β), aussi connu sous le nom de PAXIP1, qui a été décrit pour avoir un rôle dans la régulation de C/EBP α et PPAR γ en recrutant l'histone 3 lysine 4 (H3K4) méthyltransférase (MLL4) et l'ADN polymérase II au niveau de leur promoteur (Cho et al., 2009). De plus, la lysine-spécifique histone déméthylase 1A (KDM1A, aussi appelée LSD1) et la SETDB1 (H3K9 méthyltransférase SET domain bifurcated 1) montrent des effets opposés en favorisant et en inhibant la différenciation adipocytaire (Musri et al., 2010). Il a été proposé que la SETDB1 maintienne le promoteur de C/EBP α dans un état de silence, mais le recrutement de LSD1 augmentant au cours de la différenciation permettait de lever cette inhibition (Musri et al., 2010).

IV.3 Les autres mécanismes influençant l'adipogenèse

IV.3.1 Espèces réactives à l'oxygène

De nombreux autres mécanismes peuvent avoir un effet sur la cascade transcriptionnelle que nous venons de décrire. Ainsi, il a été montré que le stress oxydatif et que la génération d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) influence la fonction de plusieurs protéines impliquées dans l'adipogenèse. De nombreuses voies et molécules sont régulées par les ROS, incluant le facteur inductible hypoxique HIF1 qui inhibe PPAR γ . Le groupe de Navdeep S. Chandel a pu montrer que les cellules souches mésenchymateuses connaissent une forte biogenèse mitochondriale engendrant une forte génération de ROS lors de leur différenciation en adipocyte (Tormos et al., 2011). Ce mécanisme semble dépendant de la voie mTORC1. Enfin ils ont montré après différentes manipulations génétiques du complexe III de la chaîne mitochondriale que la génération de ROS est importante afin d'initier le processus de différenciation. Leurs résultats montrent que la génération de ROS au cours de la différenciation adipocytaire n'est pas simplement une conséquence de la différenciation, mais un événement causal favorisant l'adipogenèse (Tormos et al., 2011).

IV.3.2 Autophagie

L'augmentation du niveau d'autophagosomes lors de la différenciation semble fortement impliquer le processus autophagique au cours de la différenciation. Différentes études ont pu montrer que la perte d'Atg5 ou d'Atg7 (autophagy related genes), deux gènes importants pour l'autophagie, chez la souris engendre une perte du développement du tissu adipeux *in vivo* et un défaut de différenciation des progéniteurs adipeux (Singh et al., 2009; Zhang et al., 2009b). Dans les deux cas, cette perte de tissu adipeux entraîne une augmentation du nombre de mitochondries et une diminution de la quantité de lipides stockés. Les souris Atg5^{-/-} et Atg7^{-/-} sont sensibles à l'insuline, présentent une glycémie normale et ont une β -oxydation des acides gras plus importante (Singh et al., 2009; Zhang et al., 2009b).

IV.3.3 Rythme circadien

Différentes molécules qui ont été impliquées dans la régulation du rythme circadien ont également été décrites pour avoir un rôle dans l'adipogenèse. C'est le cas de la nocturnine (Kawai

et al., 2010), PER2 (Grimaldi et al., 2010) et RevERB α , une cible du complexe CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput) et BMAL1 (Wang and Lazar, 2008). Alors que PER2 est un inhibiteur de PPAR γ , la nocturnin facilite la translocation de PPAR γ au niveau du noyau et permet son activation par différents stimuli comme l'insuline, ou les régimes riches en gras (Kawai and Rosen, 2010).

IV.3.4 Métabolisme des lipides

De nombreuses protéines ayant un rôle dans le métabolisme lipidique sont impliquées dans la différenciation adipocytaire. C'est le cas de la GAPT3, d'AGPAT2 et de la lipin1. La perte de leur expression engendre une inhibition de la différenciation adipocytaire (Gale et al., 2006; Shan et al., 2010). La lipin1 influence la différenciation adipocytaire (Takeuchi and Reue, 2009) par sa capacité à activer PPAR γ (Koh et al., 2008). Dans les adipocytes matures, la lipin1 agit comme co-represseur de NFATC (nuclear factor of activated T cells cytoplasmic) qui est un inhibiteur de gènes comme PPAR γ , TNF α et aP2 (Kim et al., 2010a).

La perte de la caveolin-1 qui a de multiples rôles dans l'absorption des lipides et leur transport est associée à une sévère lipodystrophie chez l'Homme (Le Lay et al., 2009; Rochford, 2010). Cependant, les progéniteurs adipeux caveolin-1^{-/-} présentent une capacité de différenciation normale (Le Lay et al., 2009). Ainsi, les mécanismes de synthèse et de stockage des lipides, et la régulation de la cascade transcriptionnelle lors de la différenciation adipocytaire sont étroitement liés, mais pas inséparables.

IV.4 L'inhibition de l'adipogenèse

La différenciation des cellules souches mésenchymateuses vers un lignage particulier est régulée à la fois par une induction de différents facteurs de transcription activateurs et par l'inhibition des facteurs inhibiteurs. On peut comparer ce mécanisme à une sorte de balance où d'un côté se situe l'ensemble des facteurs favorisant la différenciation adipocytaire, et de l'autre les facteurs l'inhibant. Le côté vers lequel se penche la balance détermine alors l'engagement vers l'adipogenèse ou pas, pour une certaine proportion de cellules progénitrices. Ce concept s'illustre par les études de MacDougald, qui montrent que l'activation de la voie de signalisation Wnt inhibe la différenciation adipocytaire des cellules souches mésenchymateuses comme nous

l'avons déjà dit au début de ce chapitre (Ross et al., 2000). Au contraire, l'activation de cette voie favorise la différenciation ostéoblastique et musculaire de ces cellules (Bennett et al., 2005). Ainsi, l'exposition de progéniteurs adipeux aux ligands de la voie Wnt, ou une surexpression de la forme constitutivement active de la β -catenin inhibe l'adipogenèse en empêchant l'activation de PPAR γ et C/EBP α (Moldes et al., 2003; Ross et al., 2000). Le mécanisme exact n'est pas connu, mais il semble faire intervenir les gènes ciblés par la famille de facteur de transcription des TCF/LEF. L'expression d'un dominant négatif de TCF engendre une différenciation spontanée indiquant que la voie de signalisation canonique Wnt agit au niveau du progéniteur adipeux comme un suppresseur de l'adipogenèse (Ross et al., 2000).

Plusieurs travaux ont pu établir l'implication de différents facteurs dans l'atténuation de la différenciation adipocytaire en perturbant l'activité de C/EBP β . Ces facteurs comme GATA2/3, ETO/MTG8, CHOP10, GILZ et DIPA (Delta interacting protein A) sont exprimés dans le progéniteur adipeux, mais disparaissent lors de l'adipogenèse. Leur surexpression engendre une inhibition de la différenciation adipocytaire via une inhibition de C/EBP β empêchant ainsi l'induction de PPAR γ et C/EBP α (Bezy et al., 2005; Rochford et al., 2004; Shi et al., 2003; Tong et al., 2000; Tong et al., 2005).

D'une manière similaire à la voie Wnt, la voie de signalisation Hedgehog, connue pour son rôle important dans le développement des vertébrés, inhibe le développement du tissu adipeux par une possible induction de GATA2 (Suh et al., 2006). Le laboratoire a collecté de nombreuses données sur cette voie de signalisation qui montrent qu'elle affecte l'autorenouveau et la différenciation des progéniteurs adipeux. En effets, la signalisation Hedgehog diminue au cours de la différenciation adipocytaire des cellules hMADS. De plus, son activation engendre des adipocytes non matures insensibles à l'insuline (Fontaine et al., 2008). Le niveau basal de cette voie de signalisation dans les cellules indifférenciées semble important pour le maintien de la prolifération et des capacités clonogéniques, probablement par une régulation de la phosphorylation de pRB et de l'expression de la cycline A (Plaisant et al., 2011).

Le contrôle du niveau d'oxygène peut avoir un effet dans le développement du tissu adipeux. Divers travaux ont ainsi pu montrer que l'hypoxie inhibe la différenciation adipocytaire

par un mécanisme qui implique la répression de l'expression de PPAR γ par DEC1/Stra13. Stra13 est induit par le facteur de transcription induit par l'hypoxie HIF-1 α (hypoxia-inducible transcription factor 1 α) et par l'acide rétinoïque (Boudjelal et al., 1997), expliquant ainsi l'inhibition de l'adipogenèse induit par l'acide rétinoïque (Schwarz et al., 1997). De même, les travaux effectués au laboratoire par Ravaud C et Ladoux A montrent que IER3 (immediate early response 3) est exprimé dans les progéniteurs adipeux et qu'il intervient dans la prolifération et l'autorenouveau de ces cellules. L'expression d'IER3 est induite par l'Activin A, qui joue un rôle important dans la différenciation et dans la réponse hypoxique par l'activation de HIF-1 α (Ravaud et al., 2015).

Comme nous l'avons énoncé plus tôt, la voie de l'insuline est une voie fortement adipogénique par sa participation dans l'induction du facteur de transcription SREBP-1c. Des études complémentaires ont mis en évidence le rôle inhibiteur de la voie de l'insuline sur le facteur de transcription FoxO1. La présence d'insuline favorise la différenciation adipocytaire des progéniteurs adipeux par une phosphorylation de FoxO1 empêchant sa translocation au noyau (Nakae et al., 2003).

Enfin bien que trois des facteurs membre de la famille KLF qui sont KLF6, KLF15 et KLF 5 dont nous avons parlé plus tôt apparaissent comme étant proadipogénique, KLF2 quant à lui semble être antiadipogénique. Ainsi la surexpression de KLF2 inhibe PPAR γ 2 en se fixant certainement dans la même région que les autres éléments KLF empêchant alors la différenciation adipocytaire (Banerjee et al., 2003; Oishi et al., 2005; Wu et al., 2005).

V. Obésité

L'obésité se caractérise par un excès de tissu adipeux blanc (Figure 17). Ce syndrome accroît fortement le risque de développement de nombreuses pathologies comme le diabète de type II, l'hypertension, l'accident vasculaire cérébral et l'infarctus du myocarde (Figure 17). L'obésité est un syndrome de plus en plus répandu. Dans le monde, un milliard d'adultes sont en surcharge pondérale, dont 300 millions d'obèses. Aux États-Unis, les données collectées entre 1999 et 2002 indiquent qu'environ 1/3 des adultes sont obèses (27,6 % des hommes et 33,2 % des femmes) et qu'un enfant ou adolescent sur six est en surpoids. En France, en 2012 l'étude Obepi montre que 32 % de la population est en surpoids et 15 % est obèse.

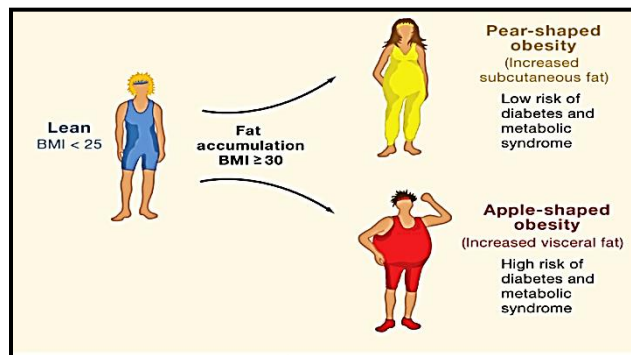


Figure 17 : Schéma représentant les risques métaboliques associés aux différents dépôts de tissu adipeux dans le cadre de l'obésité. *Illustration d'après (Gesta et al, 2006).*

Du point de vue clinique, l'obésité se mesure par l'indice de masse corporelle (IMC) correspondant au rapport du poids en kilogramme sur le carré de la taille en mètre. Ce rapport permet pour chaque individu de déterminer s'il est à son poids idéal, s'il est au contraire trop maigre, s'il est en surpoids ou obèse. L'OMS a défini l'obésité de l'adulte pour un IMC ≥ 30 kg/m² (Tableau 1). Néanmoins, cette mesure manque de précision puisqu'elle se base sur le poids total de l'individu. L'IMC ne s'applique donc pas aux personnes ayant une masse musculaire ou osseuse importante. Il existe donc d'autres indicateurs en complément de l'IMC, tels que la mesure du tour de taille par rapport au tour de hanche, ou encore la mesure du pourcentage de la masse grasse qui reste la méthode la plus précise.

	BMI kg/m ²	Obesity Class	Men ≤ 102cm (≤40 in) Women ≤ 88 cm (≤35 in)	>102 cm (>40 in) >88 cm (>35 in)
Underweight	<18.5		-	-
Normal	18.5–24.9		-	-
Overweight	25.0–29.9		Increased	High
Obesity	30.0–34.9	I	High	Very High
	35.0–39.9	II	Very High	Very High
Extreme Obesity	≥40	III	Extremely High	Extremely High

Tableau 1 : Les différentes catégories de l'IMC (BMI) et du facteur de risque relatif au poids normal et à la circonférence de la taille. *Tableau d'après (Nia Mitchell et al, 2011).*

V.1 Apparition de l'obésité

L'obésité est un processus évolutif qui passe par plusieurs phases. Elle débute par une phase où il n'y a pas de surcharge pondérale, et qui correspond à une absence clinique de tous signes pathologiques. Suit une phase initiale de prise de poids constituant un surpoids sans aucune conséquence pathologique. Si la prise de poids se poursuit elle aboutit selon une cinétique variable au stade d'obésité. Durant la phase d'obésité, la prise de poids va laisser la place à une phase dite en plateau qui, généralement s'installe dans la durée en absence d'intervention. Les phases amenant à l'obésité sont longues et sont souvent entrecoupées de tentatives de perte de poids induites médicalement, chirurgicalement ou par diverses méthodes. Ces tentatives, suivant la stratégie employée, n'aboutissent qu'assez rarement et conduisent parfois à une aggravation. On parle alors de phase de récurrence. L'obésité suit donc une évolution chronique et aboutit à un dérèglement important des systèmes contrôlant le stockage des réserves énergétiques.

L'augmentation de la masse grasse résulte d'une augmentation du volume des adipocytes (hypertrophie) et d'une augmentation de leur nombre (hyperplasie). L'hypertrophie s'explique de plusieurs manières. Tout d'abord par une prise alimentaire trop riche qui peut amener à une augmentation de taux de captation des acides gras par les adipocytes, mais aussi par une perturbation de la balance entre lipogenèse et lipolyse (Laharrague and Casteilla, 2010; Langin, 2011). L'augmentation du nombre d'adipocytes se fait par le recrutement des progéniteurs adipeux lors de l'adipogenèse (Arner et al., 2011). Il apparaît que l'hyperplasie n'est pas un processus réversible. Une fois différenciés en adipocytes les cellules ne peuvent pas retourner au stade de progéniteur. Ces cellules ont une durée de vie particulièrement longue. De ce fait, elles restent disponibles dans le tissu contribuant ainsi au fort potentiel de stockage

de l'énergie. Une fois l'hyperplasie installée, il est difficile de diminuer le volume du tissu adipeux en dessous d'un certain seuil.

Il y a donc deux composantes potentielles dans le développement de l'obésité :

- Le comportement alimentaire ;
- Les dépenses énergétiques engendrées par le métabolisme basal, l'exercice physique et la capacité de stockage de l'énergie ;

V.2 Conséquences

Lors de l'obésité, l'augmentation de la masse adipeuse va avoir différentes conséquences pathologiques sur les niveaux plasmatiques de différentes cytokines et hormones.

L'obésité est généralement connue pour être associée à une augmentation du niveau des marqueurs de l'inflammation tels que le $\text{TNF}\alpha$, l'IL6 et le CRP, incitant à la considérer comme étant associée à un état inflammatoire de bas grade chronique (Keophiphath et al., 2009; Lacasa et al., 2007). Le taux élevé de ces molécules est directement impliqué dans l'apparition de la résistance à l'insuline (Tanti et al., 2012). Celle-ci provoque une augmentation de la sécrétion d'insuline par le pancréas. À terme, les concentrations élevées d'acides gras circulants vont affecter le pancréas qui ne pourra plus produire assez d'insuline ce qui provoque un état diabétique. De plus, l'une des principales conséquences du $\text{TNF}\alpha$ est d'induire la phosphorylation d'IRS-1 ce qui provoque une perturbation de la signalisation de l'insuline (Alonso-Castro et al., 2012). L'augmentation de la production de ces facteurs pro-inflammatoires peut s'expliquer par une infiltration importante des macrophages (Tang et al., 2014) qui pourraient être responsable de leur sécrétion au niveau du tissu adipeux. On observe également une forte perte de la production d'adiponectine chez les obèses. Or l'adiponectine est notamment connue pour favoriser la sensibilité à l'insuline (Liu et al., 2015), ce qui contribue à la mise en place du diabète. De plus, cette perte d'adiponectine est connue pour être associée à une insuffisance rénale chez l'obèse (Sharma et al., 2008). On retrouve également une forte expression de PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), généralement connu pour bloquer la

dissolution des caillots intravasculaires, ce qui favorise la thrombose, et le développement des pathologies cardiovasculaires (Hotamisligil, 2006).

Il existe un grand nombre de déterminants de l'obésité :

- Les déterminants biologiques : génétiques, épigénétiques, métaboliques, hormonaux, pharmacologiques ou autres.
- Les déterminants comportementaux : psychologiques, sociaux, stress, etc
- Les déterminants environnementaux : polluants, nourriture disponible, niveau de vie, etc

Bien que les déterminants liés à l'obésité soient extrêmement nombreux, il existe des formes d'obésité purement génétiques engendrées par de rarissimes mutations, comme la mutation du gène de la leptine ou de son récepteur ou bien qui affectent des gènes spécifiques à une organelle cellulaire appelée cil primaire.

VI. Le cil primaire

Le cil primaire est une organelle fortement conservée chez les mammifères au cours de l'évolution. Il est formé par un assemblage de microtubules appelé axonème, qui se développe à partir du corps basal. Il est présent à l'état unique dans la quasi-totalité des cellules de l'organisme. Le cil primaire agit en tant qu'organelle sensorielle capable de recevoir différentes sortes de signaux depuis l'environnement extracellulaire et de les transmettre à la cellule afin d'induire une réponse biologique. De récentes études ont montré que le cil primaire jouait un rôle extrêmement important au cours du développement puisqu'il est le siège régulateur de nombreuses voies de signalisations (Haycraft et al., 2005; Ross et al., 2005; Schneider et al., 2005; Simons et al., 2005) comme Hedgehog, Wnt, PDGF, l'insuline mais qu'il est également capable de sentir les signaux mécaniques. Un dysfonctionnement du cil primaire engendre des perturbations dans la transduction du signal de ces différentes voies engendrant une série de changements pathologiques dans différents organes chez l'embryon. Dans la suite de cette étude, nous verrons les différentes caractéristiques du cil primaire au niveau de sa structure, de la régulation de sa formation, de ses fonctions, et également sur les liens directs ou indirects pouvant exister entre le cil primaire et le développement du tissu adipeux.

VI.1 Structure du cil primaire

La structure du cil primaire s'organise à partir d'un assemblage complexe de microtubules pour former l'axonème qui est recouvert d'une membrane spécialisée. L'axonème du cil primaire est composé d'un cercle de neuf doublets de microtubules (microtubule A et B), donnant une configuration dite en 9+0 (Figure 18). Cette configuration se distingue de celle des cils motiles dans laquelle on retrouve le cercle de neuf doublets de microtubules, mais qui dispose en plus d'une paire de microtubules (9+2) centraux nécessaires aux mécanismes permettant le « battement » du cil chez les mammifères. Cette architecture fait du cil primaire un cil non motile.

Chaque doublet de microtubules est composé d'un microtubule complet (microtubule A), et d'un microtubule adjacent incomplet (microtubule B). Le microtubule A est constitué de treize protofilaments de tubuline et le B de dix (Downing and Sui, 2007). Les protofilaments sont assemblés par la polymérisation longitudinale d'hétérodimères d' α et de β -tubuline en présence de GTP. Les protofilaments de tubulines sont des structures extrêmement dynamiques, dont la polymérisation est orientée. L'extrémité « moins » est sujette à une dépolymérisation, alors que la polymérisation des protofilaments se fait à l'extrémité « plus » (Haimo and Rosenbaum, 1981; Sui and Downing, 2006). L'assemblage d'un microtubule fonctionnel, et stable, requiert donc un certain nombre de modifications post-traductionnelles réversibles de la tubuline (Janke and Kneussel, 2010). Ces modifications sont particulièrement importantes au niveau du cil, où l'on retrouve diverses combinaisons de modifications incluant l'acétylation, la palmitoylation, la tyrosination et la détyrosination, la modification $\Delta 2$, la glutamylation, et la glycylation. L'acétylation est la modification post-traductionnelle la plus fréquente associée à la stabilisation des microtubules. Cependant on ne sait toujours pas si l'acétylation de la tubuline est une cause ou une conséquence de la stabilisation des microtubules (Janke and Bulinski, 2011). Après la polymérisation, l'acétylation de l' α -tubuline se produit sur la lysine 40 (LeDizet and Piperno, 1987; Sasse and Gull, 1988).

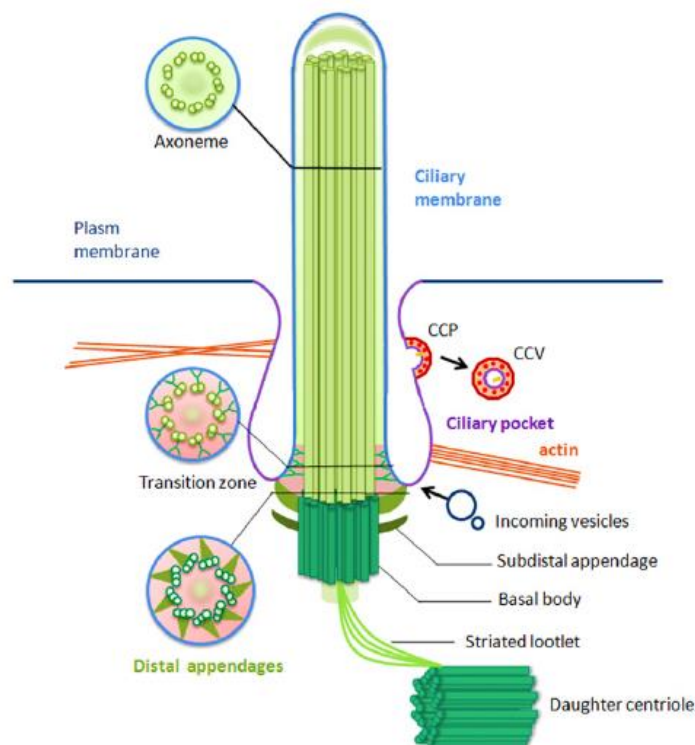


Figure 18 : Structure du cil primaire. On distingue le squelette du cil de sa membrane. Le squelette est composé d'un axonème en 9+0 et du corps basal (Gluenz et al., 2010 ; Scherft et Daems, 1967). La zone de transition se trouve dans la région qui suit directement la perte de l'organisation en triplet de microtubule où l'on retrouve les ponts en forme d'Y (Aubusson-Fleury et al., 2012 ; Gluenz et al., 2010 ; Torikata, 1988). Le centriole père et fils sont connectés par les radicelles striées (Broekhuis et al., 2013 ; Uzbekov et Prigent, 2007 ; Uzbekov et al., 2012). La poche ciliaire correspond au domaine membranaire allant des appendices distaux à la région où elle émerge dans l'environnement extracellulaire (Benmerah, 2012). Les vésicules provenant de l'appareil de Golgi fusionnent au niveau de la poche ciliaire ce qui permet de maintenir l'équilibre entre l'ajout et la perte des lipides de la membrane ciliaire (Molla-Herman et al., 2010). *Illustration d'après (Yi-Ni Ke et al., 2014).*

L'histone déacétylase 6 (HDAC6) et la sirtuine de type 2 (SIRT2) sont deux protéines qui sont colocalisées, en interaction avec le réseau de microtubules et qui agissent comme tubuline déacétylase (Hubbert et al., 2002; North et al., 2003). La protéine α TAT1 (α -tubulin acetyltransferase 1) a une fonction antagoniste à HDAC6 puisqu'elle est responsable de l'acétylation de l' α tubuline sur la lysine 40 (Li et al., 2012; Shida et al., 2010). De plus, MEC-17 et son paralogue α TAT2 acétylent la tubuline et sont exprimés dans certains neurones de *Caenorhabditis elegans* (Akella et al., 2010). La balance entre l'acétylation par α TAT1 et la déacétylation par HDAC6 de l' α -tubuline permet d'assurer la stabilité des microtubules et la fonction de l'axonème. Différents travaux tentent de montrer que ces modifications post-traductionnelles génèrent un « code tubuline » qui régule la fonction des microtubules d'une

manière similaire à celle du « code histone » (Verhey and Gaertig, 2007). En conséquence, on peut envisager que les modifications post-traductionnelles des microtubules vont permettre le recrutement de différentes protéines associées aux microtubules et moteurs moléculaires qui vont influencer la structure ainsi que la fonction du cil primaire (Verhey and Gaertig, 2007).

Les microtubules sont disposés de façon à ce que leur extrémité « moins » soit vers la base du cil, et leur extrémité « plus » pointe vers le sommet du cil. Dans beaucoup de cils, le segment où l'on retrouve une organisation en doublet des microtubules est suivie par un segment formé uniquement des microtubules A. Ces segments distaux sont retrouvés dans de nombreux organismes comme *Chlamydomonas*, *C.elegans*, chez la drosophile et dans de nombreux types cellulaires chez les mammifères (Hidaka et al., 1995; Kubo et al., 2008; Mesland et al., 1980; Shanbhag et al., 2000; Ward et al., 1975; Webber and Lee, 1975; Wen et al., 1982). Le corps basal, qui correspond au centriole père se trouve à la base du cil (Broekhuis et al., 2013). Les centrioles sont constitués de neuf triplets de microtubules dont les microtubules A et B s'allongent pour former l'axonème (Figure 18). Les centrioles père et fils, qui se situent dans la matrice péricentriolaire mesure 0,5 μm de long pour 0,2 μm de large et ont tous les deux une capacité de nucléation des microtubules. Un est une structure polarisée avec une extrémité proximale et une extrémité distale qui diffèrent morphologiquement et fonctionnellement. Le centriole père est connecté au centriole fils par 2 à 4 radicules striées émanant de la région proximale du centriole père et qui s'étendent sur la surface latérale du centriole fils. De récentes études attribuent un rôle important à ces radicules pour la fonction du cil (Uzbekov et al., 2012). L'orientation initiale du centriole père par rapport au centriole fils est perpendiculaire puisque le centriole fils pousse directement depuis la surface latérale du centriole père pendant la duplication (Uzbekov and Prigent, 2007) (Figure 18). Les appendices distaux correspondent aux fibres de transition quand le centriole père est engagé dans la formation dans la formation d'un (Kobayashi and Dynlacht, 2011) (Figure 19). Un support structurel supplémentaire est fourni par les appendices distaux qui se projettent latéralement depuis le troisième microtubule du corps basal et s'ancrent aux microtubules cytosoliques (Paintrand et al., 1992). Les fibres de transitions vont permettre la formation d'un complexe constituant une sorte de pore flagellaire comparable au pore nucléaire qui va empêcher une diffusion libre entre le cytoplasme et le cil

(Rosenbaum and Witman, 2002). La zone de transition commence à l'endroit où le troisième microtubule de chaque triplet du corps basal se termine et correspond à la région toute proximale de l'axonème et décrite initialement dans les cils motiles comme zone de l'axonème dépourvue de doublet centrale (Aubusson-Fleury et al., 2012). Au niveau de la partie proximale de la zone de transition, les ponts en forme Y connectent chaque doublet de microtubules à la membrane ciliaire. Cette aire formée par le rattachement de la membrane ciliaire à l'axonème, appelée collier ciliaire, adopte une structure en forme de pointillés et permet à la membrane ciliaire d'acquies sa spécialisation (Torikata, 1988). La zone de transition contenant des structures en Y persiste dans la majeure partie de la longueur du cil connecteur des cellules photoréceptrices (Gluenz et al., 2010).

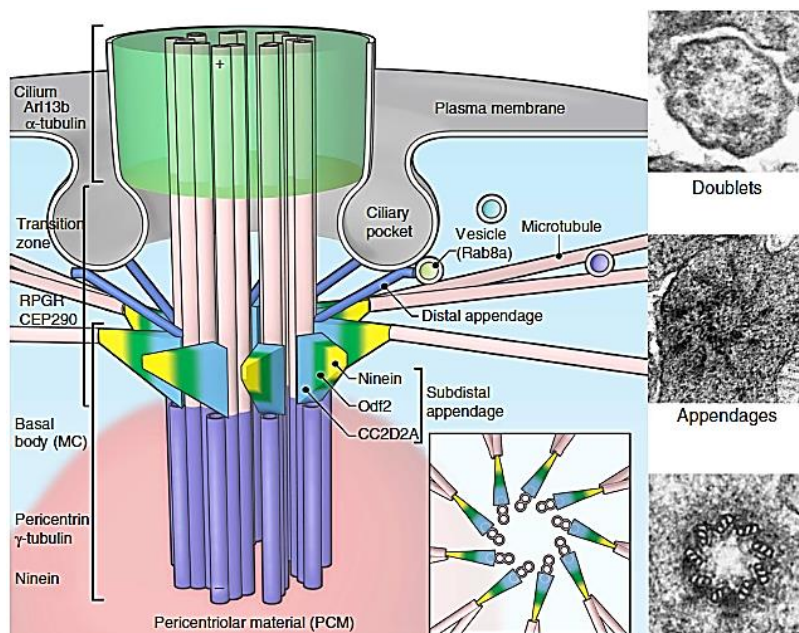


Figure 19 : Structure du corps basal et des différentes protéines qui lui sont associées. Le corps basal est organisé en triplet de microtubules (cylindres violets) qui se prolongent en doublets de microtubules au niveau de l'axonème (cylindres roses). Les protéines localisées au niveau du cil et du corps basal sont indiquées. Les neuf extensions latérales de chaque doublet de microtubule au bord du centriole mère et de la zone de transition représentent les appendices subdistaux (bleu, vert, jaune; pyramide) et les appendices distaux (bâtons bleus). Les protéines localisées au niveau des appendices subdistaux sont montrées en ordre depuis le centre vers la périphérie en se basant sur les preuves expérimentales (Shobi Veleri et al., 2014). Les appendices subdistaux s'encrent au réseau de microtubules et aident au transport des vésicules à la base du cil. Les appendices distaux attachent le centriole mère à la membrane et séparent le compartiment ciliaire du cytoplasme. Les cercles verts représentent Rab8a. Les clichés de microscopie électronique sur la droite montrent les sections transversales des niveaux indiqués : l'axonème au sommet, les appendices au milieu et le corps basal en bas. *Illustration d'après (Shobi Veleri et al., 2014)*

Bien que la membrane du cil soit en continuité de la membrane plasmique, la composition de ces deux membranes est différente (Ounjai et al., 2013). La membrane du cil est enrichie en stérols, en glycolipides et en sphingolipides et certaines études montrent un possible enrichissement en phosphatidylinositol 4-phosphate et en phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (Bielas et al., 2009; Bloodgood, 1995; Jacoby et al., 2009; Kaneshiro et al., 1984; Kaya et al., 1984; Souto-Padron and de Souza, 1983). Cette composition est assurée par une barrière de diffusion qui empêche la diffusion des lipides en séparant la membrane ciliaire de la membrane plasmique (Vieira et al., 2006). En 2010 différentes études ont permis d'établir que les septines situées à la base du cil forment une barrière qui restreint la diffusion des protéines membranaires à l'intérieur et à l'extérieur du cil (Hu et al., 2010; Kim et al., 2010c).

L'ensemble des travaux sur le cil primaire montre que son architecture peut être variable d'un type cellulaire à un autre. Ainsi, dans les cellules de l'épithélium rénal, la symétrie des neuf doublets de microtubules assemblés en anneau est progressivement perdue vers la région distale du cil (Gluenz et al., 2010). Cette perte de symétrie résulte par une incursion progressive des doublets de microtubules vers le centre de l'axonème (Figure 20). Les cils primaires peuvent aussi montrer une structure 7+2 ou 8+1 au sein de différents tissus et organismes (Dahl, 1963; Webber and Lee, 1975; Wheatley, 1967). Dans les ostéocytes, le cil primaire est de très petite taille et présente des doublets de microtubules irréguliers, ce qui signifie que la matrice extracellulaire osseuse peut avoir un effet dans le maintien de la structure du cil (Uzbekov et al., 2012). Comme nous l'avons dit le cil peut présenter dans sa partie supérieure neuf microtubules solitaires à la place de doublets. Ce n'est pas le cas de tous les cils, mais cette perte du microtubule incomplet (microtubule B) semble se faire par une dépolymérisation des protofilaments jusqu'à leur rupture mettant fin à la dépolymérisation (Mandelkow et al., 1991). Cette asymétrie est importante, puisqu'elle facilite la mécano-sensibilité des cils, les rendant plus sensible aux flux extracellulaire. C'est le cas des cils du tubule collecteur rénal qui détecte le flux d'urine (Bui et al., 2012; Ueno et al., 2012).

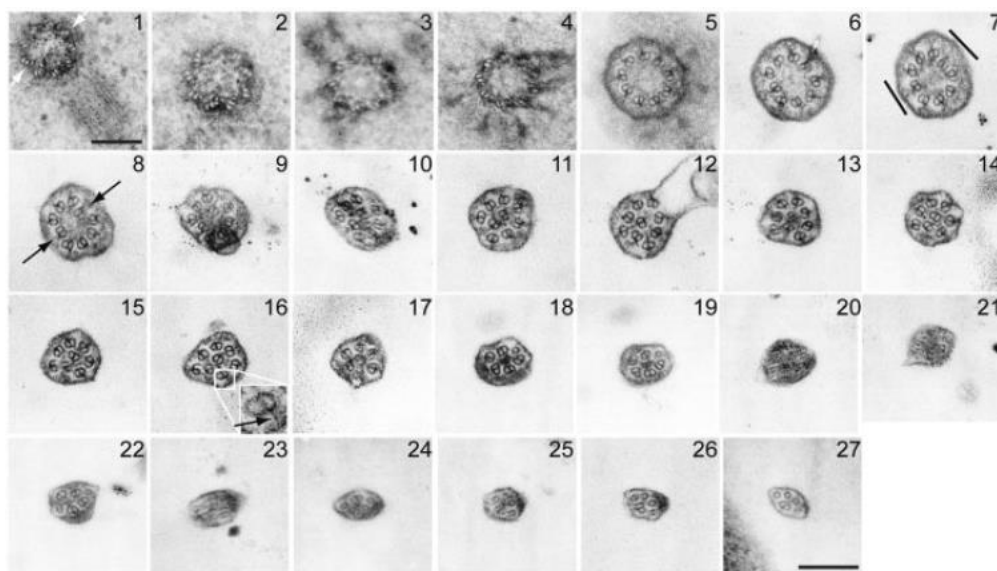


Figure 20 : Déplacement des microtubules dans le cil primaire des cellules rénales. Les nombres indiquent la série des sections le long de l'axonème qui vont du corps au sommet de l'axonème. Le cil a une architecture 9+0. (7) l'aplatissement de l'axonème, indiqué par les lignes, est le premier signe du déplacement des doublets. (8 ; flèches) les connections liant les doublets à la membrane persistent. (16 ; insert, flèche) Le déplacement des doublets dans le cil est clairement observé. *D'après (Eva Gluenz et al., 2010).*

La nature hybride du cil primaire peut être observée dans différents tissus et organismes. Par exemple le cil nodal que l'on retrouve au niveau du nœud embryonnaire possède un axonème en 9+0, mais est motile. Ce cil possède des bras de dynéines qui permettent de provoquer une rotation de la structure, mais d'une manière complètement différente de celle des cils motiles canoniques. Le battement de ces cils va notamment permettre de mettre en place la symétrie gauche droite de l'embryon chez les vertébrés en assurant la diffusion des morphogènes (Okada et al., 2005). D'autres cils primaires sont doués de motilité. C'est le cas par exemple du cil des cellules néonatales du plexus choroïdien qui battent vigoureusement, et dont la motilité diminue progressivement pendant les deux semaines nécessaires à la différenciation des cellules (Narita et al., 2012).

Au regard de ce que nous venons de dire il apparaît que la plupart des connaissances que nous avons sur le cil primaire proviennent indirectement de ce qui a été découvert sur les cils motiles comme le flagelle du spermatozoïde, ou les cils motiles de l'épithélium respiratoire dans différents organisme comme la drosophile, l'oursin, et certaines cellules de vertébrés (Takeda and Narita, 2012).

VI.2 Transport intraflagellaire

Le transport des protéines au niveau du cil est assuré par un système spécialisé appelé IFT (intraflagellar transport). L'IFT transporte les protéines sous la forme d'un grand complexe, appelé cargo, et dont la taille est variable, depuis la base du cil, le long de l'axonème jusqu'au sommet par les moteurs kinésines (transport antérograde), et depuis le sommet du cil à sa base par les moteurs moléculaires dynéines (transport rétrograde) (Figure 21).

Différentes protéines qui composent chaque unité fonctionnelle du transport intraflagellaire ont été identifiées et caractérisées. La plupart d'entre elles sont conservées dans les organismes ciliés, mais ne sont pas présentes dans les organismes non ciliés comme les végétaux ou les champignons (Avidor-Reiss et al., 2004; Li et al., 2004). Chaque unité de l'IFT est composée d'au moins trois sous-complexes dont la composition va dépendre de la fonction : les protéines motrices du cil, les protéines du complexe A et du complexe B (Cole and Snell, 2009) que nous détaillerons au cours de ce chapitre. On retrouve aussi les protéines formant le BBSome, un assemblage protéique, impliqué dans le trafic des protéines membranaires au niveau du cil. Il se déplace le long de l'axonème avec la même vitesse que les unités de l'IFT ce

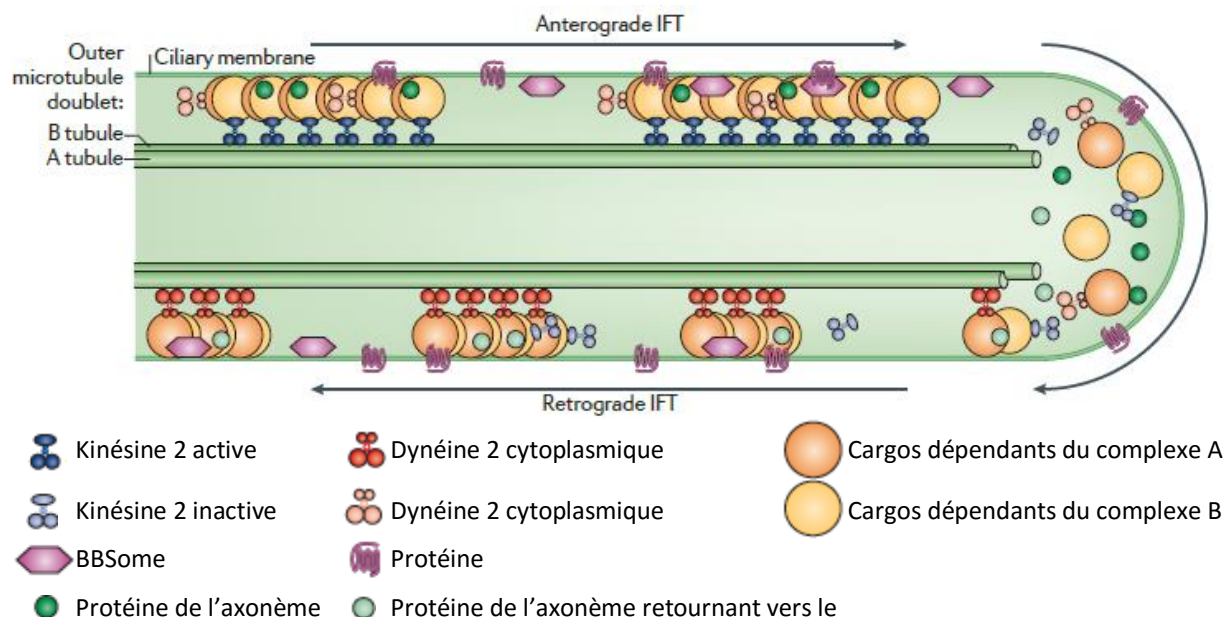


Figure 21 : Machinerie du transport intraflagellaire. Au cours du transport antérograde, la kinésine 2 est activée et la dynéine 2 est en quelque sorte maintenue inactive pour permettre le mouvement antérograde. Au sommet du cil, le transport intraflagellaire lâche les protéines axonémales et réarrange sa conformation pour le transport rétrograde. Illustration d'après (Hiroaki Ishikawa et al., 2011).

qui amène à les considérer comme un sous-groupe des unités associées au transport intraflagellaire (Blacque et al., 2004; Lechtreck et al., 2009a; Nachury et al., 2007; Ou et al., 2005; Ou et al., 2007).

VI.2.1 Les protéines motrices du transport intraflagellaire

La principale kinésine du cil est la kinésine-II, un complexe hétérotrimérique qui appartient à la famille des kinésines-2 (Miki et al., 2005). La kinésine II est constituée d'un assemblage de deux sous-unités motrices, KIF3A et KIF3B, et une sous-unité non motrice KAP3 (Cole et al., 1992; Cole et al., 1993). L'inactivation de la kinésine II inhibe l'assemblage du cil et le transport intraflagellaire dans différentes espèces comme *Chlamydomonas*, *Drosophila* et la souris (Kozminski et al., 1995; Marszalek et al., 1999; Nonaka et al., 1998; Sarpal et al., 2003).

L'inactivation de la kinésine-II chez *C. elegans* n'empêche pas la formation du cil et le transport intraflagellaire. Cela s'explique par la présence dans cet organisme, d'une autre kinésine motrice, OSM-3, dont l'implication au niveau du cil est confirmée par l'incapacité des neurones sensoriels à assembler un cil lorsque ces deux kinésines sont absentes (Snow et al., 2004). Différentes études, à la fois *in vitro* et *in vivo* ont pu montrer que la kinésine II et OSM-3 coopèrent au transport des cargos (Pan et al., 2006; Snow et al., 2004). Cependant, ces deux protéines sont retrouvées ensemble jusqu'au milieu de l'axonème, c'est-à-dire jusqu'à la fin de la partie de l'axonème organisé en doublets de microtubules. En effet, OSM-3 semble être la seule responsable du transport antérograde dans le segment distal du cil (Snow et al., 2004). La segmentation du cil sensoriel chez *C. elegans* est similaire à celle du cil des cellules photoréceptrices de la rétine chez les mammifères. Dans ces cellules, la kinésine-II est restreinte à la partie proximale du cil, alors que l'orthologue d'OSM-3, KIF17 est retrouvé dans le segment proximal et distal du cil et semble important seulement pour la formation de la partie distale (Beech et al., 1996; Insinna et al., 2009; Muresan et al., 1999).

Le complexe de protéines motrices responsable du transport rétrograde est la dynéine 2 cytoplasmique. La dynéine 2 est composée d'une chaîne lourde homodimérique, DYNC2-H1, d'une chaîne légère intermédiaire, DYNC2LI1, d'une chaîne intermédiaire WDR34, et d'une chaîne légère DYNLL1. Les mutants pour les différents composants de la dynéine 2 chez

Chlamydomonas, C. elegans et la souris montrent un cil de taille réduite avec un transport intraflagellaire saturé (Hou et al., 2004; Huangfu and Anderson, 2005; May et al., 2005; Orozco et al., 1999; Pazour et al., 1999).

VI.2.2 Les Complexes A et B du transport intraflagellaire

Chaque unité fonctionnelle du transport intraflagellaire consiste en un assemblage de deux complexes (IFT-A et IFT-B) qui se dissocient en présence de fortes forces ioniques (Cole et al., 1998). Aujourd'hui six protéines du complexe A (IFT43, IFT121, IFT122, IFT139, IFT140 et IFT144) et 14 protéines du complexe B (IFT20, IFT22, IFT25, IFT27, IFT46, IFT54, IFT52, IFT57/55, IFT70, IFT74/72, IFT80, IFT81, IFT88 et IFT172) (tableau 2) sont connues (Bacaj et al., 2008;

IFT system component	General protein name	Chlamydomonas reinhardtii	Caenorhabditis elegans	Homo sapiens	Other
Kinesin-2	Heterotrimeric	FLA10	KLP-20	KIF3A	
		FLA8	KLP-11	KIF3B	
		FLA3	KAP-1	KAP3, KIFAP3	
Kinesin-2	Homodimeric	–	OSM-3, KLP-2	KIF17	Kin5
Cytoplasmic dynein 2 ²	Heavy chain	DHC1B	CHE-3	DYNC2H1	
	Intermediate chain	FAP133	DYCI-1	WDR34	
	Light Intermediate chain	D1BLIC	D2LIC, XB1-1	DYNC2L1	
	Light chain	LC8, FLA14	DLC-1	DYNLL1	
IFT complex A	IFT144	IFT144	DYF-2	WDR19	
	IFT140	IFT140	CHE-11	IFT140	
	IFT139	IFT139	ZK328.7	THM1, TTC21B	
	IFT122, IFT122A	IFT122, FAP80	DAF-10	IFT122, WDR10	
	IFT121, IFT122B	IFT121	IFTA-1	WDR35	
	IFT43	IFT43	–	IFT43, C14orf179	
IFT complex B	IFT172	IFT172	OSM-1	IFT172	
	IFT88	IFT88	OSM-5	IFT88	Tg737, Polaris
	IFT81	IFT81	IFT-81	IFT81	
	IFT80	IFT80	CHE-2	IFT80, WDR56	
	IFT74, IFT72	IFT74, IFT72	IFT-74	IFT74, IFT72	
	IFT70	IFT70, FAP259	DYF-1	TTC30A, TTC30B	Fleer
	IFT57	IFT57	CHE-13	IFT57	Hippi
	IFT54	IFT54, FAP116	DYF-11	IFT54, TRAF3IP1, MIPT3	Elipsa
	IFT52	IFT52, BLD1	OSM-6	IFT52, NGD5	
	IFT46	IFT46	DYF-6	IFT46, C11orf60	
	IFT27	IFT27	–	IFT27, RABL4	
	IFT25	IFT25, FAP232	–	IFT25, HSPB11	
	IFT22	IFT22, FAP9	IFTA-2	RABL5	
	IFT20	IFT20	Y110A7A.20	IFT20	
IFT complex A accessory		TLP1	TUB-1	TULP3	
IFT complex B accessory		FAP22	DYF-3	CLUAP1	Qilin
		DYF13	DYF-13	TTC26	
BBSome	BBS1	BBS1	BBS-1	BBS1	
	BBS2	–	BBS-2	BBS2	
	BBS4	BBS4	F58A4.14	BBS4	
	BBS5	BBS5	BBS-5	BBS5	
	BBS7	BBS7	BBS-7	BBS7	
	BBS8	BBS8	BBS-8	BBS8	
	BBS9	BBS9	BBS-9	BBS9	
	BBIP10	–	–	BBIP10	

Tableau 2 : Composant du système de transport intraflagellaire. *Tableau d'après(Hiroaki et al., 2011).*

Blacque et al., 2006; Follit et al., 2009; Kunitomo and Iino, 2008; Lechtreck et al., 2009b; Li et al., 2008a; Omori et al., 2008; Schafer et al., 2006). La distinction entre ces deux complexes n'est pas seulement biochimique, mais aussi fonctionnelle. En effet, les mutations des protéines du complexe A engendrent un cil court et trapu avec des renflements remplis de protéines IFT, alors que les mutations des protéines du complexe B conduisent à une absence de cil ou à un cil très court (Arts et al., 2011; Cole, 2003; Iomini et al., 2004; Piperno et al., 1998). Ces différences de phénotypes laissent penser que les protéines du complexe A fonctionnent dans le transport rétrograde et que les protéines du complexe B sont impliquées dans le transport antérograde.

La fonction exacte des protéines du complexe A et B n'est pas connue, néanmoins de plus en plus de preuves tendent à montrer qu'ils forment un intermédiaire entre les protéines motrices et les cargos. Par exemple, la protéine IFT54 du complexe B semble lier le complexe du transport intraflagellaire et la membrane associée au complexe (Omori et al., 2008). IFT20 est localisée au niveau de l'appareil de Golgi et au niveau du cil et semble jouer un rôle important dans l'adressage des protéines au niveau du cil (Follit et al., 2006). La protéine du complexe B IFT172 est requise dans la transition entre le transport antérograde et le transport rétrograde au sommet du cil (Pedersen et al., 2005; Tsao and Gorovsky, 2008).

VI.2.3 Les protéines BBS (Bardet-Biedl Syndrome)

Le syndrome de Bardet-Biedl est une ciliopathie caractérisée par une obésité, un retard mental, une dégénérescence rétinienne et par la présence de kystes rénaux (Zaghloul and Katsanis, 2009). Jusqu'à présent les 14 gènes codant pour les différentes protéines BBS ont été reliés à cette pathologie et les preuves indiquant que les problèmes au niveau du cil sont la conséquence prédominante des phénotypes associés au syndrome de Bardet-Biedl sont nombreuses. Toutes les protéines BBS sont localisées au niveau du corps basal et de l'axonème du cil. L'évolution des gènes BBS est restreinte aux espèces ciliées et leur expression semble se limiter aux cellules exprimant un cil. Ensemble, sept protéines BBS (BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, et BBS9) (Figure 22) forment un complexe appelé le BBSome, qui est crucial pour la fonction du cil (Nachury et al., 2007). Les protéines BBS se déplacent le long de l'axonème à la même vitesse que les protéines motrices et les protéines du complexe A et B (Blacque et al., 2004; Lechtreck et al., 2009a; Nachury et al., 2007; Ou et al., 2005; Ou et al., 2007). Les cellules

des souris invalidées pour des protéines BBS ont toujours un cil primaire, bien qu'il présente parfois certains défauts structuraux (Davis et al., 2007; Mykytyn et al., 2004; Nishimura et al., 2004; Ross et al., 2005). Chez *C. elegans*, la perte de fonction de BBS1, BBS7 ou BBS8 engendre une dissociation des complexes A et B où le complexe A est transporté par la kinésine-II et le complexe B par OSM-3 (Ou et al., 2005; Ou et al., 2007). De plus, on observe une mauvaise localisation et une accumulation au niveau de la zone de transition du canal TRPV (Transient Receptor Potential Vanilloid) et d'OSM-9 (Tan et al., 2007). Dans les neurones des souris invalidées pour BBS2 et BBS4, les récepteurs couplés aux protéines G SSTR3 et MCHR1 ne sont plus situés au niveau du cil (Berbari et al., 2008).

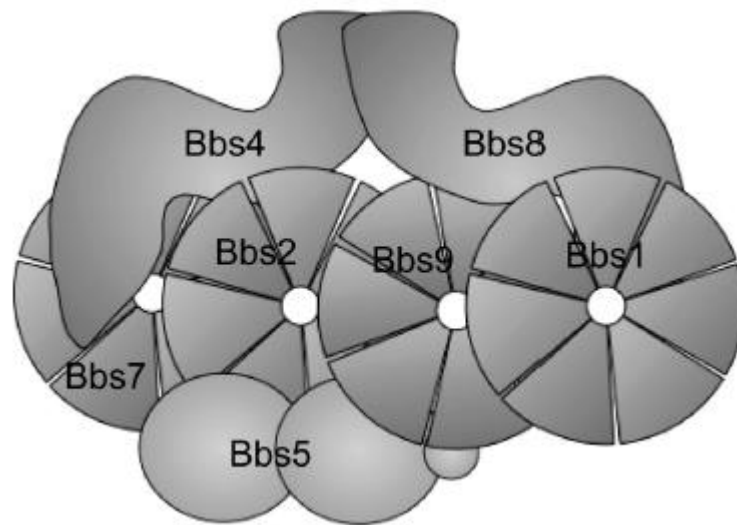


Figure 22 : Schéma représentant le complexe BBSome montrant les interactions protéine-protéine. Illustration d'après (Val C. Sheffield).

Le complexe du BBSome s'associe avec la membrane ciliaire et permet de trier et de diriger les protéines ou les vésicules adressées à la membrane ciliaire par un mécanisme impliquant la Rabin 8 et la petite protéine G Rab8 (Figure 23). De plus, il semble particulièrement important pour le maintien des complexes du transport intraflagellaire. En accord avec sa localisation, BBS3 recrute le complexe BBSome au niveau de la membrane du cil (Loktev et al., 2008).

Les trois protéines BBS appartenant à la famille des chaperonnes (BBS6, BBS10 et BBS12) (Figure 23) peuvent interagir ensemble pour former un autre complexe en interaction avec une autre protéine chaperonne de la famille CCT (chaperonin containing TCP-1), aussi connue sous

le nom de TriC (TCP-1 ring complex) (Seo et al., 2010). De plus BBS7 semble s'associer directement avec ce complexe chaperonne. Enfin l'ablation de BBS6, BBS10 ou BBS12 abolit l'interaction des protéines qui forment le BBSome démontrant l'importance de ce complexe de chaperonne dans l'assemblage du BBSome (Seo et al., 2010).

La fonction des protéines BBS restantes est beaucoup moins bien caractérisée. BBS11 est

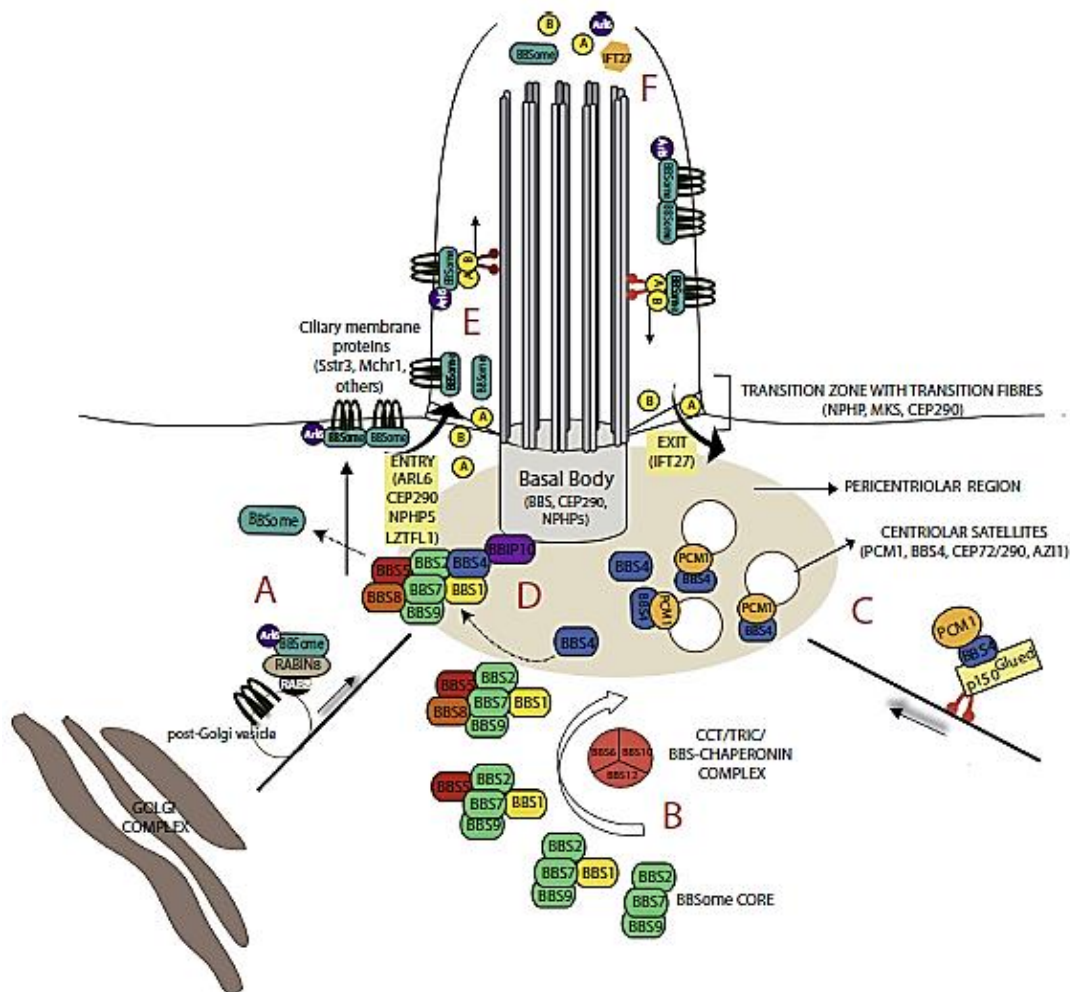


Figure 23 : Schéma représentant les rôles connus des différentes protéines BBS. Résumé des rôles proposés pour le BBSome dans le cil. (A) Le BBSome reconnaît et interagit avec les vésicules portant des protéines transmembranaires destinées au cil. (B) L'assemblage du BBSome implique une série d'intermédiaires complexes dont la formation est facilitée par l'action complexe chaperonne CCT/TRiC/BBS (composé de BBS6, BBS10 et BBS12). (C) BBS4 est impliqué dans le transport des protéines vers la région péricentriolaire de façon dépendante au transport médié par les dynéines dépendantes des microtubules. (D) La région péricentriolaire semble avoir un rôle de réservoir pour BBS4 contrôlant ainsi la disponibilité du BBSome. (E) Le BBSome participe à la formation de la machinerie du transport intraflagellaire et de son transport au niveau du sommet du cil. (F) Le désassemblage du BBSome est connu pour engendrer un remaniement de l'IFT au sommet du cil et le recrutement des cargos destinés à la sortie de l'espace ciliaire via les protéines du complexe A. Illustration d'après (Rossina Nova et al., 2015).

une ubiquitine ligase E3 (Chiang et al., 2006; Locke et al., 2009). BBS3 se situe au niveau des centrosomes pendant la mitose et joue un rôle dans la diversité de la morphogenèse cellulaire (Dawe et al., 2007), BBS14 est importante pour le transport de protéines associées aux microtubules (Chang et al., 2006) et BBS15 est requise pour la mise en place de la polarité cellulaire (Kim et al., 2010c). Cependant les mécanismes exacts impliqués dans l'assemblage des complexes BBS et de leurs activités moléculaires médiées par des complexes au-delà de ceux dépendants du cil restent à identifier. Néanmoins, l'existence de telles connections fonctionnelles et interdépendantes entre les différentes protéines BBS permet d'expliquer la similarité des phénotypes des patients atteints par les mutations des différents gènes BBS. Enfin, il est possible qu'en plus de leur implication dans les complexes BBS, les protéines BBS pourraient être impliquées dans la fonction ciliaire et/ou d'autres processus cellulaires.

VI.3 Ciliogenèse

Le cil se retrouve dans les cellules quiescentes et en phase G1 du cycle cellulaire. Dans les cellules en division, le cil primaire se résorbe avant la phase S ou pendant la phase G2 du

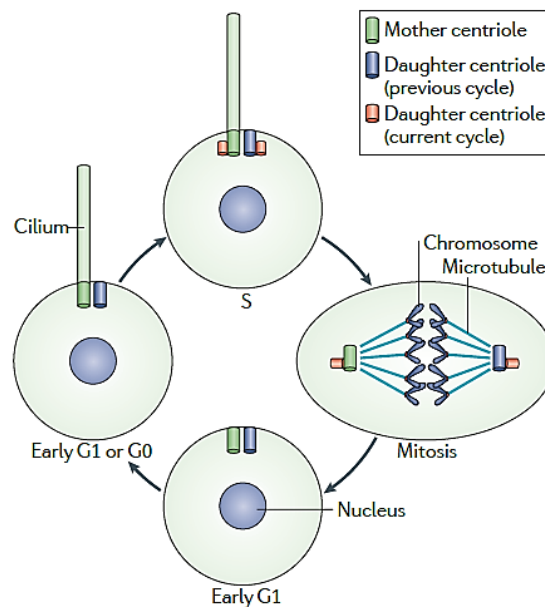


Figure 24 : Synchronisation de l'assemblage du cil avec le cycle cellulaire. Les cellules en sorties de mitose ne possèdent pas de cil. Au cours de la phase G0/G1 le centriole père se fixe à la membrane et forme un cil. Pendant la phase S, les centrioles père et fils se dupliquent. Avant la mitose, dans la plupart des cellules le cil est résorbé, ce qui permet à la paire de centriole de se détacher de la membrane et de se déplacer au niveau des pôles de la cellule afin de produire le fuseau mitotique. Le cil est de nouveau généré dans les deux cellules filles en G0/G1. *Illustration d'après (Hiroaki Ishikawa et al., 2011).*

cycle cellulaire (Figure 24). Il semble y avoir des interférences entre la formation du cil et la division cellulaire, ainsi une mitose inadéquate peut entraîner une ciliogenèse anormale. Les lignées de cellules cancéreuses très prolifératives n'expriment pas de cils primaires en général, et les cellules qui ne peuvent pas former de cil subissent une division cellulaire inappropriée et une kystogenèse comme c'est le cas de nombreuses ciliopathies connues pour être la cause de kystes rénaux. L'identification d'une variété de voie de signalisation dans ce processus a permis de fournir certaines preuves sur les mécanismes moléculaires associant la ciliogenèse et le cycle cellulaire.

De nombreuses protéines reliées au cil ont été reconnues comme perturbateurs du cycle cellulaire, parmi lesquelles on trouve des médiateurs du désassemblage de l'axonème. La perte de la protéine centrosomale Nde1, qui interagit avec la sous-unité de la dynéine cytoplasmique LC8 engendre une augmentation de la taille du cil et retarde la ré-entrée dans le cycle cellulaire (Kim et al., 2011), alors que la phosphorylation de Tctex-1, une chaîne légère de la dynéine cytoplasmique, induit une résorption du cil et favorise l'entrée en phase S du cycle (Li et al., 2011). En plus des sous-unités de dynéine, les kinases Aurora sont particulièrement importantes pour le désassemblage du cil. La perte de la protéine CALK homologue à Aurora prévient le désassemblage du cil chez *Chlamydomonas* (Pan et al., 2004) et son état de phosphorylation est aussi bien un marqueur de l'absence de cil que de sa taille (Luo et al., 2011; Pan et al., 2004). Aurora A qui est un homologue humain de CALK, a été décrit pour être à la fois nécessaire et suffisant pour le désassemblage du cil primaire dans les cellules hTERT-RPE1 et régule l'entrée en mitose via son rôle dans l'organisation du fuseau mitotique (Pugacheva et al., 2007). Il existe d'autres mécanismes régulant le désassemblage du cil chez *Chlamydomonas*, comme l'augmentation de l'ubiquitination de certaines protéines du cil incluant la tubuline, la sous-unité de la dynéine IC2, et différentes protéines de signalisation pendant la résorption (Huang et al., 2009). De la même manière, plusieurs protéines de l'axonème sont méthylées au cours du désassemblage du cil (Schneider et al., 2008).

Les kinases NRK ou NEK de la famille des NIMA (never in mitosis) comme Nek8 sont des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (O'Regan et al., 2007). Plusieurs NRK ont été décrites pour avoir à la fois un rôle dans la progression du cycle cellulaire, et dans la

régulation du cil (Mahjoub et al., 2002; Parker et al., 2010; Parker and Quarmby, 2003). D'autres NRK/NEK comme Cnk2p favorisent la perte du cil et l'entrée en mitose (Bradley and Quarmby, 2005).

Certaines protéines précédemment identifiées comme des modulateurs du cycle cellulaire influencent la ciliogenèse. On retrouve parmi elles Cdc14b, un antagoniste de Cdk1 qui a un rôle important dans la ciliogenèse et la régulation de la taille du cil chez le poisson zèbre (Clement et al., 2011).

La formation du cil primaire dépend de la libération du centriole père, après la cytokinèse, de son rôle de centrosome pendant la division cellulaire. L'ensemble des données récoltées sur les liens existant entre le cycle cellulaire et le cil semble montrer que la séquestration du corps basal par le cil inhibe la progression dans le cycle cellulaire. D'un autre côté, une progression abusive dans le cycle cellulaire peut empêcher la formation du cil en restreignant le corps basal à son rôle de centrosome au cours de la mitose. Cela explique que de nombreuses protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire soient également impliquées dans la ciliogenèse, comme c'est le cas des protéines de la famille NRK/NEK qui régulent ces processus en contrôlant le centrosome et la structure de cil.

Dans certaines cellules de mammifères, l'étape la plus précoce de la ciliogenèse est la fixation d'une vésicule ciliaire au centriole père dont la fixation est assurée par les appendices

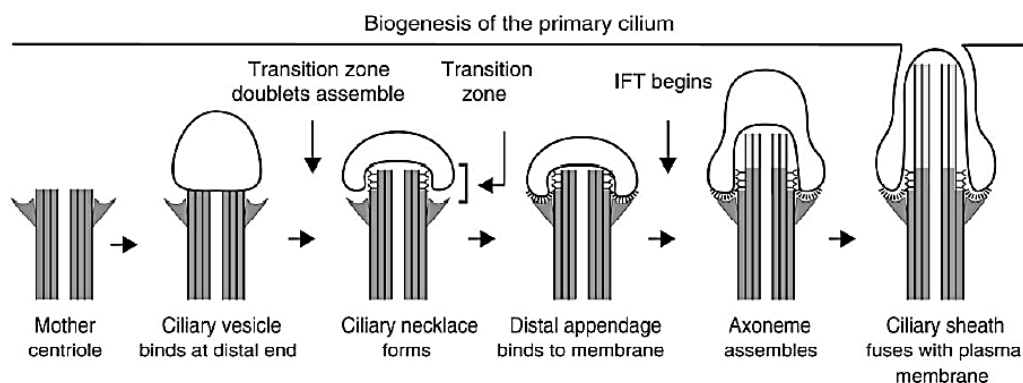


Figure 25 : Biogenèse du cil primaire. Ce modèle est dérivé de celui de Sorokin. Il est à noter ici que la double membrane enveloppe l'axonème avant qu'il atteigne la surface cellulaire. La membrane interne est la membrane ciliaire et la membrane externe va former la poche ciliaire une fois fusionnée à la membrane plasmique. *Illustration d'après Rajat Rohatgi et al., 2010.*

distaux (Sorokin, 1962; Sorokin, 1968) (Figure 25). La façon dont cette vésicule acquiert ses spécificités reste à déterminer. On ne sait pas si le centrosome père sélectionne une vésicule qui a des propriétés ciliaires, ou bien s'il impose ces propriétés à une vésicule naïve. Dans certaines cellules, le corps basal lié à la vésicule ciliaire va migrer à la membrane plasmique des cellules. Cette étape dépend du cytosquelette d'actine et de certains composants associés à la zone de transition comme MKS1 et MKS3 (Dawe et al., 2007; Lemullos et al., 1988). La formation du cil se poursuit par une élongation intracytosolique de l'axonème provoquant l'invagination de la face inférieure de la vésicule ciliaire, dont la surface augmente au fur et à mesure à l'aide de vésicules ciliaire secondaire. Cet allongement se poursuit jusqu'à la fusion de la face supérieure avec la membrane plasmique pour créer la membrane ciliaire, et ainsi exposer le cil primaire au milieu extracellulaire. Cette étape n'est pas conservée dans d'autres types cellulaires comme dans les cellules multiciliées ou épithéliales, où l'interaction directe du corps basal avec la membrane plasmique précède l'élongation de l'axonème (Dawe et al., 2007). Dans les deux cas le cil acquiert une zone ayant les mêmes caractéristiques qu'une zone de transition le long de l'axonème en croissance et de la membrane ciliaire. Une fois la membrane ciliaire formée l'axonème subit une forte croissance produisant une importante extension de la membrane ciliaire dans le milieu extracellulaire. Ce modèle proposé par Sorokin en 1968 reste encore à confirmer, mais il reste largement accepté par la communauté scientifique et sert de base à de nombreux travaux (Sorokin, 1968).

La perte d'une protéine ou plus, associée à la zone de transition peut engendrer des problèmes de migration du centriole ou de fixation de la membrane dans les cellules de mammifères et chez le nématode *C. elegans*, ce qui tend à impliquer fortement les protéines de la zone de transition dans la ciliogenèse précoce (Williams et al., 2011). Différentes équipes ont pu montrer que ces protéines de la zone de transition forment un complexe supramoléculaire dont la nature et l'ultrastructure commencent à peine à être comprises en terme de génétique et de protéomique (Chih et al., 2012; Garcia-Gonzalo et al., 2011; Sang et al., 2011; Williams et al., 2011). Les preuves de l'implication de ce « super complexe » viennent d'observations montrant une perturbation importante des ponts Y après l'élimination de plusieurs paires de protéines de la zone de transition chez *C. elegans* ou de la protéine centrosomale CEP290 chez

Chlamydomonas (Huang et al., 2011; Sang et al., 2011; Williams et al., 2011). En plus de leur rôle structurel potentiel, les protéines de la zone de transition peuvent interagir avec des protéines transmembranaires (Garcia-Gonzalo et al., 2011; Huang et al., 2009; Sang et al., 2011; Smith et al., 2006; Valente et al., 2010; Weatherbee et al., 2009; Williams et al., 2011), ce qui pourrait leur conférer des fonctions telles que des interactions avec la machinerie de transport vésiculaire, la fusion de la vésicule ciliaire avec la membrane plasmique et faciliter l'ancrage du corps basal à la membrane en sécurisant la connections des ponts Y à celle-ci.

Une fois la croissance du cil terminée, le cil reste une structure fortement dynamique. En effet, le sommet du cil est en permanente polymérisation et dépolymérisation. La taille du cil ne variant pas signifie que la balance entre la polymérisation et la dépolymérisation est à l'équilibre (Marshall and Rosenbaum, 2001). Le sommet du cil a donc un besoin important d'incorporation de nouvelles tubulines pour contre balancer la dépolymérisation (Song and Dentler, 2001). Les protofilaments composants chaque doublet de microtubules ont leur extrémité « plus » orientée vers le sommet du cil. Par conséquent la dépolymérisation des microtubules au sommet du cil ne semble pas être un processus spontané, mais être un processus actif dans lequel le moteur moléculaire Kinésine 13 semble être impliqué (Blaineau et al., 2007; Dawson et al., 2007; Piao et al., 2009).

VI.4 Contrôle de la ciliogenèse

La ciliogenèse est un mécanisme en forte coordination avec le cycle cellulaire, et qui par conséquent est soumis à une importante régulation. Un ensemble de protéines régulatrices est requis pour éviter la conversion non programmée du père en corps basal dans les cellules en division. Ce contrôle est assuré par le recrutement d'un ensemble de facteurs négatifs et positifs de la ciliogenèse au niveau du centriole père pendant la formation du corps basal. CP110 (centrosomal protein 110) et ses partenaires d'interactions comme Cep97 et la kinésine Kif24 ont été identifiées comme étant des régulateurs négatifs de la formation du cil (Kobayashi et al., 2011; Spektor et al., 2007). Leur niveau diminue fortement au cours de l'assemblage du cil. La surexpression de ces protéines supprime la formation du cil, alors que leur suppression engendre une ciliogenèse aberrante (Kobayashi et al., 2011; Spektor et al., 2007). CP110 se situe à l'extrémité distale du centriole régulant sa taille et la taille du cil, et dont la stabilité est

assurée par son interaction avec Cep97 (Kobayashi et al., 2011; Spektor et al., 2007). Au niveau du centriole père, la perte de CP110 et Cep97 se produit uniquement au cours de la mitose et est suffisante pour induire la ciliogenèse (Schmidt et al., 2009). Kif24 est un membre de la famille des kinésines dépolymérisantes de microtubules et colocalise avec CP110 (Kobayashi et al., 2011). Son action de dépolymérisation des microtubules centriolaires est importante pour l'assemblage de l'axonème du cil (Kobayashi et al., 2011). D'autres protéines proches de CP110 ont été identifiées pour leur impact négatif sur la ciliogenèse. C'est le cas de la trichoplein que l'on ne retrouve plus au niveau du corps basal au cours de la ciliogenèse, et dont la déplétion favorise la ciliogenèse, alors que sa surexpression empêche la croissance du cil (Inoko et al., 2012) (Figure 26). D'un autre côté, des protéines sont reconnues pour favoriser la ciliogenèse, c'est le cas de la Ser/Thr kinase TTBK2 (Goetz et al., 2012). Dans les cellules déplétées en sérum, TTBK2 est localisée au niveau de l'extrémité distale du corps basal où il déplace CP110 et recrute le complexe de transport intraflagellaire. L'ablation de cette kinase chez la souris conduit à une perte du cil et induit une ataxie cérébrospinale chez l'Homme. De plus, les cellules invalidées pour TTBK2 se distinguent par une présence persistante de CP110 au niveau du corps basal (Goetz et al., 2012). D'autres études pointent quant à elles, l'importance de la phosphorylation de certains substrats et essayent de déterminer si ces substrats sont directement impliqués dans les premières phases de la ciliogenèse. Enfin la Ser/Thr kinase MARK4 favorise l'assemblage du cil (Kuhns et al., 2013). La perte de cette kinase rappelle la perte de TTBK2, elle perturbe le complexe CP110-Cep97 au niveau du corps basal et provoque une perte de l'assemblage de l'axonème, alors que l'attachement du corps basal à la vésicule ciliaire n'est pas impacté (Figure 26). Cette observation suggère que l'activité de MARK4, comme le déplacement de CP110, fait partie d'un processus de régulation qui se met en place au moment où la vésicule ciliaire fusionne avec la membrane plasmique, avant la croissance de l'axonème.

En plus des protéines importantes pour l'assemblage de l'axonème, le contrôle de la ciliogenèse se fait aussi sur des étapes plus précoces comme l'ancrage du corps basal, ou la fusion de vésicules à la base du cil. Ainsi, le chargement en GTP de la GTPase Rab8a au niveau des appendices distaux par son GEF (guanine nucleotide exchange factor) Rabin8 semble

favoriser l'ancrage et la fusion de vésicules à la base de la membrane ciliaire favorisant la ciliogenèse (Nachury et al., 2007). La paire de GTPase-GEF Cdc42-Tuba joue un rôle critique au cours de la ciliogenèse. Cdc42 interagit avec le complexe d'exocytose et est nécessaire pour sa localisation au niveau du cil primaire (Zuo et al., 2011). L'ancrage du centriole à la membrane nécessite d'autres protéines centrosomales comme la Talpid3 (Yin et al., 2009), Chibby (Love et al., 2010), OFD1 (Singla et al., 2010), ODF2 (Ishikawa et al., 2005), et d'autres protéines qui sont généralement associées à différentes ciliopathies et que l'on retrouve dans la zone de transition dans la partie distale du corps basal (Williams et al., 2011).

De nombreuses études pointent le rôle du cytosquelette d'actine sur le contrôle de la ciliogenèse et la taille du cil. En effet, dans de nombreux cas, il semble que l'actine corticale permet la ciliogenèse, alors que les fibres de stress d'actine inhibent la formation du cil. La destruction du réseau de filaments d'actines par un traitement à la cytochalasine D, qui détruit préférentiellement les fibres de stress dans les cellules de mammifères en culture, engendre

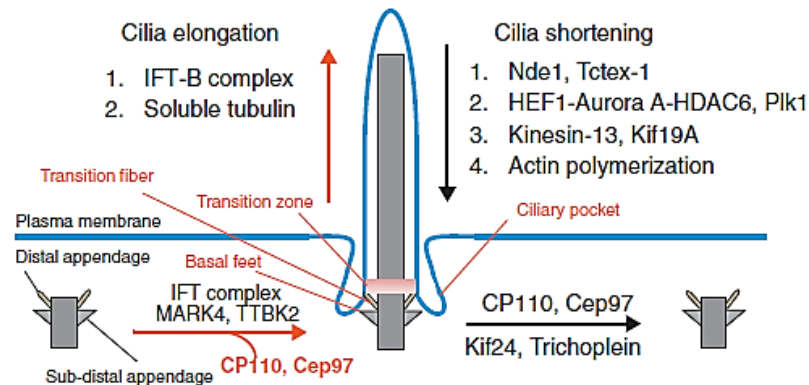


Figure 26 : Résumé des facteurs ayant une influence sur l'assemblage ou le désassemblage du cil. Lors de la formation et de l'élongation (flèche rouge), les composants de l'IFT, MARK4 et TTBK2 sont recrutés au niveau du corps basal, alors que les inhibiteurs du cil tels que CP110, Cep97, Kif24 et la trichopleine sont déplacés. L'élongation du cil est directement favorisée par l'abondance et le taux de mobilité des complexes de l'IFT-B et de la disponibilité de tubuline soluble en tant que précurseur de l'axonème. De façon inverse (flèche noire), CP110, Cep97, Kif24 et la trichopleine sont exprimés au niveau du corps basal. De plus, d'autres facteurs comme des protéines du complexe A de l'IFT, ou impliqués dans la déacétylation de l'axonème, la dépolymérisation des microtubules et la polymérisation de l'actine inhibent l'assemblage du cil. *Illustration d'après Sehyun Kim et al., 2013.*

une élongation du cil (Bershteyn et al., 2010; Kim et al., 2010b; Sharma et al., 2011). Néanmoins, le ciblage préférentiel des fibres de stress par la cytochalasine D n'est pas encore clairement démontré et semble davantage être cellule spécifique (Friedland-Little et al., 2011). Dans les cellules primaires dermiques, la destruction du réseau d'actine par un traitement à la

cytochalasine D engendre une élongation du cil et une résistance à un désassemblage induit du cil (Bershteyn et al., 2010). Dans les cellules endothéliales, une augmentation du niveau d'AMPc engendre une activation de la PKA et de la PKC et provoque une redistribution de cytosquelette d'actine ainsi qu'une augmentation de la taille du cil (Abdul-Majeed et al., 2012). Dans tous les cas, une destruction des fibres de stress, ou une redistribution du cytosquelette d'actine semble stabiliser le cil et inhiber son désassemblage.

En plus du cytosquelette d'actine et des protéines du centrosome, l'autophagie semble être un important régulateur de la ciliogenèse. L'autophagie est un processus de dégradation des protéines, fortement activé en période de carence énergétique (Yang and Klionsky, 2010). L'autophagie est impliquée dans la dégradation de certains composants essentiels à la ciliogenèse comme IFT20 et de protéines inhibitrices de la ciliogenèse comme la protéine OFD1 en périphérie de centriole (Tang et al., 2013) (Figure 27). Cela confère au processus

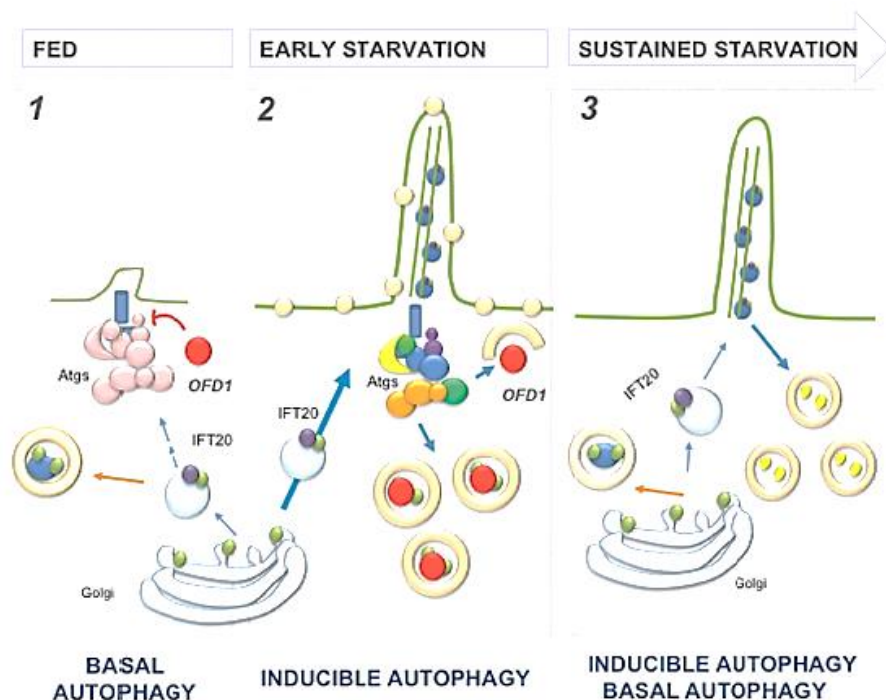


Figure 27 : L'autophagie en tant que modulateur de la ciliogenèse. (1) L'autophagie de base empêche la croissance du cil en conditions basal par la dégradation des protéines impliquées dans le transport intraflagellaire comme IFT20. (2) Immédiatement après la déplétion des nutriments, l'induction de l'autophagie favorise la dégradation des inhibiteurs endogènes de la ciliogenèse. (3) Si la déplétion est maintenue, l'autophagie commence à dégrader des protéines telle qu'IFT20 afin d'éviter une croissance illimitée du cil. *Illustration d'après I. Orhon et al., 2015.*

autophagique la capacité de contrôler la taille du cil en réponse aux changements environnementaux. La dégradation d'IFT20 se fait principalement via une autophagie basale (Pampliega et al., 2013) en l'absence de tout stress métabolique (figure 27). Suite à une privation en sérum l'autophagie va préférentiellement cibler OFD1 permettant une activation de la ciliogenèse (Tang et al., 2013). OFD1 fonctionne comme un suppresseur de la ciliogenèse, par conséquent sa dégradation en périphérie du centriole suite à l'induction de l'autophagie permet la mise en place de la ciliogenèse (Figure 27). D'une manière intéressante, si la privation en sérum persiste, IFT20 redevient une cible préférentielle de l'autophagie ce qui régule négativement la croissance du cil (Figure 27). Ce changement entre l'autophagie basale et l'autophagie induite montre qu'en condition basale, IFT20, un régulateur positif de la ciliogenèse, est dégradé par l'autophagie, alors qu'OFD1 est localisé dans la région péricentriolaire inhibant la ciliogenèse. Lors d'une privation en sérum, OFD1 est dégradé par le processus autophagique, IFT20 reprend son rôle dans le trafic ciliaire et contribue à la ciliogenèse.

Une fois que les protéines importantes pour la formation de l'axonème sont synthétisées, elles doivent être transportées au cil depuis le cytoplasme et déplacées vers leur site d'assemblage au sommet du cil par le transport intraflagellaire. Comme nous l'avons évoqué lors de sa description, différentes mutations de protéines importantes pour son fonctionnement entraînent une perturbation de la ciliogenèse. De ce fait le transport intraflagellaire présente de nombreux points de contrôle potentiels de la ciliogenèse. En effet, différentes caractéristiques du transport intraflagellaire, comme la taille des complexes transportés et/ou leur vitesse, leur fréquence et la sélection des protéines transportées sont des points pouvant être soumis à différents mécanismes qui ne sont toujours pas décrits. Le cil en croissance requiert une quantité importante de protéines au sommet de l'axonème impliquant la nécessité de réguler le transport intraflagellaire. Il a été observé chez *Chlamydomonas*, au cours de la régénération du flagelle, que la quantité des cargos transportés par chaque train d'IFT diminue à mesure que la taille du cil augmente, bien que la fréquence des unités de l'IFT reste indépendante de la taille du flagelle (Engel et al., 2009). Ainsi, plus le cil est petit et plus les cargos amenés au cil sont importants, délivrant plus de protéines au sommet du flagelle en

croissance. Cependant les mécanismes de régulation de la taille des cargos transportés par le transport intraflagellaire restent à déterminer. Comme la plupart des protéines IFT et de l'axonème s'accumulent à la base du cil (Qin et al., 2004), il est probable que l'assemblage du complexe du transport intraflagellaire et leur chargement sélectif se fasse au niveau de la zone de transition. Parmi les protéines IFT, IFT27 (Qin et al., 2007) semble être un acteur important de la régulation du transport intraflagellaire. En effet IFT27 est une petite protéine G de la famille Rab qui a une grande importance dans la régulation des différents processus de trafic à la membrane cellulaire. La compréhension de la régulation d'IFT27 et l'identification des cibles en amont modulant son hydrolyse nucléotidique semble être une piste intéressante dans la compréhension de la régulation de la ciliogenèse au niveau du transport.

VI.5 Modèles de contrôle de la taille du cil

Il existe plusieurs modèles de contrôle de la taille du cil se basant sur les données existantes. Le modèle le plus simple consiste à dire qu'une cellule produit exactement la quantité de protéine requise à l'assemblage du cil. Cependant nous savons que la disponibilité des protéines ciliaires n'est pas limitante du fait que les expériences d'inhibition de la synthèse protéique par un traitement à la cycloheximide, entraînant la perte de toutes les protéines axonémales, réduit la taille des cils de moitié (Rosenbaum et al., 1969). De plus, la faible corrélation entre la taille des cils et leur nombre par cellule n'est pas en accord avec ce genre de modèle (Kuchka and Jarvik, 1982; Marshall et al., 2005).

Un autre modèle est celui proposé par Marshall (Marshall et al., 2005; Marshall and Rosenbaum, 2001) dont nous avons parlé précédemment qui se base sur différentes observations chez *Chlamydomonas*. Tout d'abord, au cours de sa régénération l'assemblage du flagelle diminue au fur et à mesure que le flagelle s'allonge (Marshall, 2002; Rosenbaum and Child, 1967). Deuxièmement, lorsque le transport intraflagellaire antérograde est inhibé par une mutation sensible à la température, la taille du flagelle diminue ce qui suggère que la tubuline au sommet du flagelle est constamment en renouvellement (Marshall, 2002; Song and Dentler, 2001; Stephens, 1997). Enfin, le désassemblage de l'axonème qui se met en place induit une résorption constante indépendante de la taille (Kozminski et al., 1995; Marshall et al., 2005; Marshall and Rosenbaum, 2001; Parker and Quarmby, 2003). Le point d'équilibre est atteint

lorsque le taux d'assemblage au sommet du cil est équivalent au taux de désassemblage. Lorsque le cil est de petite taille, le taux d'assemblage est prédominant conduisant ainsi à son élongation jusqu'au point d'équilibre. Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, on pense que la quantité des protéines amenées au sommet du cil est de plus en plus faible à mesure que la taille du cil s'accroît (Engel et al., 2009) (Figure 28).

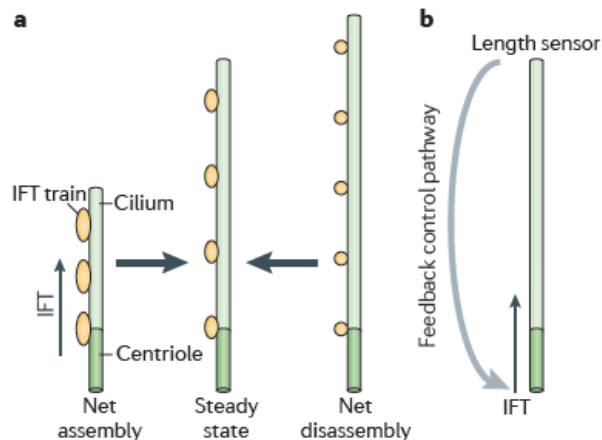


Figure 28 : Modèles de contrôle de la taille du cil. (a) Modèle dit en point d'équilibre. Dans ce modèle, la quantité de cargo transportée par le transport intraflagellaire est inversée proportionnellement à la taille du cil. La quantité totale des protéines de l'IFT, ainsi que leur fréquence le long de l'axonème est indépendante de la taille, alors que la taille des cargos diminue en fonction de la taille du cil (Engel, B. D., Ludington et al., 2009). L'assemblage du cil est en permanence équilibre par le désassemblage au sommet du cil. Dans les cils courts, l'assemblage est prédominant sur le désassemblage ce qui conduit à l'élongation du cil (gauche). Dans les long cils, le désassemblage prédomine sur l'assemblage ce qui conduit à son raccourcissement puisque l'IFT transporte des cargos plus petits (droite). (b) Le modèle de contrôle de la taille par rétroaction, dans lequel un mécanisme sensible à la taille du cil (actuellement inconnu) permet l'activation des voies de signalisation qui vont moduler l'assemblage du cil en réponse à sa dynamique. *Illustration d'après Hiroaki Ishikawa et al., 2011.*

Le modèle de contrôle de la taille du cil illustré dans la figure 28 se base principalement sur les données obtenues chez *chlamydomonas*. D'autres modèles que celui-ci sont envisagés et bien que différents, ces modèles expliquent la régulation de la taille du cil de la même façon, à savoir par une régulation entre l'assemblage et le désassemblage de l'axonème au sommet du cil de façon dépendante du transport intraflagellaire.

Un modèle a alors été proposé dans lequel le chargement et la taille des trains de l'IFT ne varient pas, mais dans lequel l'apport de nouvelle tubuline est dépendante de la fréquence des trains de l'IFT. Ainsi, lorsque le cil est court, l'apport de tubuline est important, puisque la

distance à parcourir par les trains de l'IFT est faible impliquant un « temps de transport » faible. Lorsque le cil est long cet apport est faible puisque la distance à parcourir est importante, ce qui implique un « temps de transport » important. Ce modèle se fonde sur une diminution de la fréquence du transport intraflagellaire (que reflète le nombre de trains par unité de temps) au cours de l'allongement, qui n'a pas été confirmée par des mesures du trafic ; celles-ci suggèrent plutôt une fréquence quasi invariante au cours de l'allongement (Dentler, 2005).

Récemment, des données obtenues *in vivo* chez *chlamydomonas* ont permis de suivre le devenir des précurseurs de l'axonème par leur association à la GFP. Les résultats de ces observations ont permis de noter que la quantité transportée par unité de temps diminue au cours de l'élongation du flagelle, en accord avec un modèle d'équilibre entre assemblage et désassemblage. Le nombre d'évènements de transport de ces précurseurs est en accord avec la taille attendue du flagelle. Dans ce cas, c'est le taux de chargement des trains, et non leur taille, qui contrôlerait la longueur du flagelle (Wren et al., 2013).

Enfin, on peut envisager que la vitesse des trains le long de l'axonème puisse être variable, ce qui permettrait d'assurer un apport de la tubuline plus ou moins rapide expliquant ainsi l'existence de cils plus longs ou plus courts (Besschetnova et al., 2010; Pan and Snell, 2005)

VI.6 Désassemblage du cil

Les données récoltées sur le désassemblage du cil sont fortement liées à la régulation du cil au cours de la mitose (Konno et al., 2012). Ainsi, de récents travaux impliquent des régulateurs connus de la mitose : AuroraA et la protéine avec laquelle elle interagit, HEF1, dans le contrôle du désassemblage du cil (Pugacheva and Golemis, 2005; Pugacheva et al., 2007). AuroraA est un membre de la famille des kinases lpl, et est modestement reliée à la kinase CALK impliquée dans la rétractation du flagelle chez *Chlamydomonas* (Bischoff et al., 1998; Marumoto et al., 2005; Pan et al., 2004). La suractivité d'AuroraA et d'HEF1 est associée avec des centrosomes surnuméraires et un fuseau mitotique multipolaire (Pugacheva and Golemis, 2005). Ces deux protéines sont localisées au niveau du centrosome pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire et juste avant le désassemblage du cil, les deux sont activées au niveau du corps basal des cellules hTERT-RPE (Pugacheva et al., 2007). L'utilisation de siRNA contre

AuroraA, ou son inhibition pharmacologique engendre un blocage du désassemblage du cil, alors que l'injection d'une forme active d'AuroraA favorise la perte du cil. De plus, l'inhibition de HEF1 par l'utilisation de siRNA engendre une réduction du niveau d'activation d'AuroraA. L'ensemble de ces données suggère que HEF1 pourrait stabiliser et activer AuroraA qui initierait le désassemblage du cil.

HDAC6, contrairement à ce que son nom indique n'est pas une déacétylase des histones, mais une déacétylase de l' α -tubuline acétylée et semble être un élément important dans le désassemblage du cil médié par AuroraA (Pugacheva et al., 2007). En effet, l'activation d'AuroraA n'est pas suffisante pour induire de façon efficace le désassemblage du cil dans des cellules déplétées pour HDAC6 indiquant qu'HDAC6 agirait en aval d'AuroraA. Cette hypothèse est en accord avec les études *in vitro* montrant qu'HDAC6 peut être un substrat d'AuroraA (Pugacheva et al., 2007). Ainsi, au moment de la réentrée en mitose la présence des facteurs de croissances induirait l'expression de HEF1, permettant de ce fait l'activation d'AuroraA. Par la suite, AuroraA phosphoryle HDAC6, qui par son activation va entraîner une déstabilisation des microtubules du cil primaire par la déacétylation de la tubuline axonémale, ce qui conduit à la rapide résorption du cil primaire (Pugacheva et al., 2007) (Figure 29).

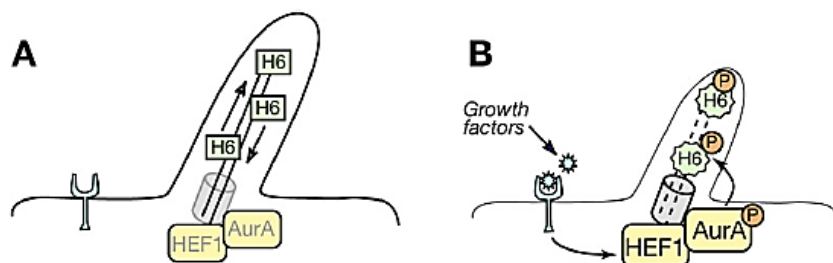


Figure 29 : Schéma représentant l'activation d'HDAC6 conduisant au désassemblage du cil primaire.

- (A) Aurora A (AurA) et HEF1, exprimé faiblement, sont présents au niveau du corps basal dans les cellules ciliées quiescentes.
- (B) En présence de facteurs de croissance, l'induction de l'expression de HEF1 permet l'activation d'AurA par phosphorylation qui va alors activer HDAC6 et induire la résorption du cil.

Illustration d'après Elena N. Pugacheva et al., 2007.

L'ensemble de ce que nous venons de voir nous permet d'établir un modèle simple de la dynamique coordonnée du cil avec le cycle cellulaire. L'inhibition de CP110 permet d'induire la ciliogenèse en G0/G1, alors que l'activation d'AuroraA favorise le désassemblage du cil en G2.

VI.7 La membrane ciliaire

Comme nous avons pu le voir, le cil est une organelle extrêmement dynamique, de par la régulation de sa taille, mais aussi par sa coordination avec le cycle cellulaire. La membrane du cil primaire subit quant à elle un renouvellement constant même dans les cellules en phase de quiescence (Bloodgood, 1984). Dans la partie suivante, nous nous focaliserons sur la membrane ciliaire à travers certaines de ses caractéristiques structurelles comme le collier, la poche ciliaire, les fibres de transitions et leurs rôles respectifs sur la régulation des protéines membranaires et des lipides adressés au cil.

VI.7.1 Le rôle de la poche ciliaire dans le trafic vésiculaire

La poche ciliaire est l'invagination de la membrane en périphérie du cil. Elle est une conséquence directe de la ciliogenèse intracellulaire (Ghossoub et al., 2011; Molla-Herman et al., 2010; Rohatgi and Snell, 2010; Sorokin, 1968). Comme nous l'avons vu, dans les cellules épithéliales, le centrosome migre directement au niveau de la membrane apicale. Par la suite le cil s'allonge depuis le corps basal directement dans le milieu extracellulaire sans former de poche ciliaire. Les cellules faisant parties d'un lignage différent, comme les fibroblastes ou les cellules musculaires ne suivent pas exactement le même mécanisme puisque le corps basal se fixe préalablement à la vésicule ciliaire. La contrainte mécanique engendrée par l'assemblage de l'axonème à la base de la vésicule ciliaire est soulagée par l'arrivée des vésicules ciliaires secondaires augmentant ainsi sa surface (Molla-Herman et al., 2010). La fusion de la partie externe de la vésicule avec la membrane plasmique permet d'exposer le cil au milieu extracellulaire et ainsi de former la poche ciliaire.

Un certain nombre de travaux montrent une forte présence de clathrine au niveau de la poche ciliaire permettant ainsi de lui attribuer un rôle important dans l'endocytose (Fonte et al., 1971; Haycraft et al., 2005; Molla-Herman et al., 2010; Poole et al., 1985) (Figure 30). Les clathrines ne sont pas spécifiques à la poche ciliaire, en effet on en retrouve sur l'ensemble de la

membrane. De ce fait l'endocytose au niveau de la poche ciliaire n'apporte qu'une faible contribution à l'endocytose globale de la cellule (Molla-Herman et al., 2010). Ainsi, elle pourrait être impliquée spécifiquement dans l'internalisation des composants du cil lors du recyclage des protéines et des lipides membranaires. Cette caractéristique lui attribue un rôle dans le contrôle de l'homéostasie du cil puisqu'elle contribuerait ainsi à l'élimination des protéines en excès à la membrane ciliaire ou à celles qui ne lui sont pas correctement adressées. L'identification des protéines internalisées permettrait de confirmer le rôle de l'endocytose dans le maintien de la composition lipidique et protéique de la membrane ciliaire.

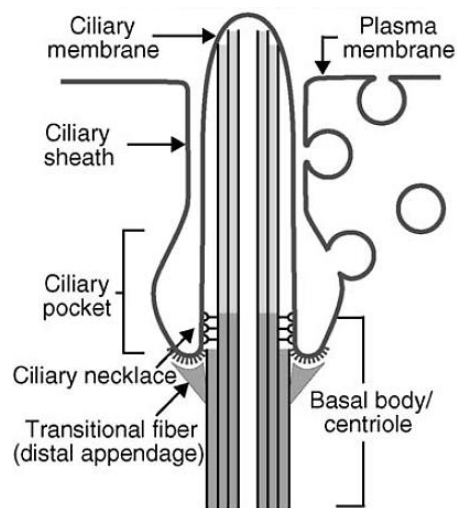


Figure 30 : Diagramme de la poche ciliaire et de ses structures associées

En plus des endosomes, d'autres populations de vésicules comme les lysosomes sont retrouvées à la base du cil (Rattner et al., 2010; Segretain, 1989). Cette diversité, ainsi que de récentes observations tendent à attribuer à la poche ciliaire un rôle dans l'exocytose (Baldari and Rosenbaum, 2010; Griffiths et al., 2010). Cette fonction pourrait expliquer la diversité de taille de la poche ciliaire d'un type cellulaire à un autre.

Enfin les travaux réalisés sur les cils photorécepteurs indiquent que la région en périphérie du cil semble être un site de fixation préférentielle des vésicules associées aux protéines du transport intraflagellaire telles qu'IFT20 et IFT52, provenant de l'appareil de Golgi (Sedmak and Wolfrum, 2010; Tai et al., 1999). Il est fort probable que la poche ciliaire joue un rôle spécifique dans la fixation et la fusion des vésicules contenant les protéines adressées au cil. Néanmoins il est fort probable que ce mécanisme se produise aussi dans les cellules

présentant un cil ne possédant pas de poche ciliaire, dans une région spécifique de la membrane plasmique à la base du cil primaire (Nachury et al., 2010).

VI.7.2 Le rôle des structures associées à la membrane ciliaire

Le collier et les fibres de transitions contribuent chacun à la barrière de diffusion dont le rôle est d'empêcher le déplacement libre des protéines membranaires entre la membrane ciliaire et la membrane plasmique. En se basant sur les expériences de marquage des complexes cholestérol-filipin en micrographie par cryofracture dans les cellules multiciliées (Montesano, 1979), il apparaît que la membrane ciliaire au niveau du collier ciliaire possède une composition lipidique différente de la membrane recouvrant l'axonème. On retrouve une forte présence de complexes filipin-stérol au niveau de la membrane au-dessus du collier ciliaire alors que celle-ci en est dépourvue. Les stérols peuvent jouer un rôle important dans la localisation des protéines à la membrane ciliaire (Rohatgi et al., 2007). En accord avec les études sur le stérol, l'utilisation d'une sonde membranaire Laudran et la diffusion de protéines fluorescentes liées au glycosylphosphatidylinositol (GPI), ont montré que la base du cil a une composition lipidique unique ou l'on observe une zone condensée de lipides pouvant former la barrière de diffusion et ainsi séparer la membrane plasmique de la membrane ciliaire (Vieira et al., 2006). Enfin, bien qu'il n'existe aucune preuve de l'implication de la poche ciliaire dans la barrière de diffusion, on peut être amené à suspecter que la forte incurvation de la membrane ciliaire à la base de la poche pourrait imposer elle-même une contrainte géométrique sur le mouvement des lipides et des protéines membranaires à travers cette région (Rohatgi and Snell, 2010). De plus, la forte interaction entre les fibres de transition et la membrane pourrait également gêner le mouvement des protéines membranaires à travers ce site (Rohatgi and Snell, 2010). L'importance relative de chacune de ces trois structures reste à déterminer.

VI.7.3 Transport des protéines membranaires au niveau du cil

Alors que l'on attribue le transport des protéines à la membrane ciliaire au trafic vésiculaire à la base du cil, une autre possibilité serait que les protéines de la membrane plasmique puissent se déplacer latéralement jusqu'à la membrane ciliaire en traversant les barrières imposées par la poche et le collier ciliaire. L'existence d'un tel mécanisme a été rapportée par les travaux sur les molécules d'adhésion appelées agglutinines chez

Chlamydomonas (Goodenough, 1989; Hunnicutt et al., 1990; Musgrave et al., 1986). Dans cet organisme, la fertilisation est initiée lorsque les gamètes des sexes opposés adhèrent l'un à l'autre via les agglutinines de leur flagelle. Cette adhésion conduit à la perte des agglutinines actives du flagelle et à leur remplacement ultérieur par les agglutinines provenant du corps cellulaire. D'une manière intéressante, il a été observé que ce remplacement déclenché par l'adhésion n'était pas dû à l'exocytose des vésicules intracellulaires (comme le modèle l'aurait prédit), mais était plutôt provoqué par le transport latéral des agglutinines depuis la membrane plasmique à la membrane flagellaire (Pan and Snell, 2002). De plus, ce mouvement n'apparaît pas comme dépendant du transport intraflagellaire distinguant ainsi ce mécanisme de la voie canonique, vésicule de Golgi → base du cil → transport des cargos par l'IFT (Baldari and Rosenbaum, 2010). Il est important de souligner la difficulté d'analyser le rôle du transport intraflagellaire dans le déplacement des protéines à l'intérieur ou hors du cil. En effet, la perturbation de ce mécanisme engendre la plupart du temps d'importants défauts structuraux du cil.

Pendant longtemps, le cas des agglutinines est resté le seul exemple de transport latéral. Néanmoins il a été montré récemment dans les cellules de mammifère que la protéine de la voie de signalisation Hedgehog, Smoothened (Smo), se déplace de la membrane plasmique à la membrane ciliaire en suivant un processus de déplacement latéral similaire lorsque la voie est activée par la présence de Sonic Hedgehog (Milenkovic et al., 2009). Une autre étude suggère que Smo peut être adressé au cil via un déplacement depuis le cytoplasme ce qui montre que ces deux mécanismes d'adressage au cil peuvent être empruntés au moment de l'activation de la voie Hedgehog (Wang et al., 2009). Enfin, de nombreuses études montrent de façon similaire que le transport latéral des agglutinines et de Smo peut être régulé par la voie de l'AMPc (Goodenough, 1989; Hunnicutt et al., 1990; Milenkovic et al., 2009; Wilson et al., 2009).

Les protéines qui se déplacent au niveau du cil en empruntant le transport vésiculaire ou par déplacement latéral doivent toujours finir par traverser la barrière de diffusion pour pouvoir avoir accès à la membrane ciliaire. Leur déplacement à la poche ciliaire doit cependant être régulé de façon fondamentalement différente. Pour certaines, les mécanismes de régulation pourraient réguler le conditionnement des cargos dans les vésicules adressées au cil, ou

contrôler la fusion des vésicules avec la poche ciliaire. Pour les autres, c'est leur mouvement latéral depuis la membrane plasmique vers la membrane ciliaire qui doit être régulé.

VII. Cil primaire et contrôle des voies de signalisation

De récentes études ont pu montrer des connections entre le cil primaire et la voie de signalisation Hedgehog chez les mammifères. Les protéines du transport intraflagellaire sont requises pour induire les différentes réponses à la stimulation de la voie Hedgehog. De plus, les protéines effectrices de cette voie sont enrichies au niveau du cil primaire. Les différents phénotypes des souris invalidées pour les protéines de la ciliogenèse suggèrent que le cil puisse agir de façon à organiser les étapes successives de la transduction du signal de la voie Hedgehog. Le cil des cellules des vertébrés est aussi important pour d'autres voies de signalisation comme celles de Wnt, du PDGF ou encore celles de Notch et de certains récepteurs couplés aux protéines G. Dans la partie suivante nous décrirons brièvement certaines voies de signalisation, mais nous nous attarderons particulièrement sur la voie Hedgehog du fait que le cil est spécialisé dans la transduction du signal de cette voie.

VII.1 Signalisation du PDGF α

La voie de signalisation du PDGF (platelet-derived growth factor) est utilisée par une large variété de processus cellulaires au cours du développement comme la prolifération, la survie, et la migration de nombreux types cellulaires (Heldin and Westermark, 1999). Une activation inappropriée de la voie PDGF est fortement liée à une variété de pathologies (Pietras et al., 2003).

Des travaux effectués à partir de fibroblastes NIH3T3 ont permis de mettre en avant une relation entre le cil et la signalisation induite par le récepteur au PDGF α (Schneider et al., 2005). Ces travaux montrent, dans les cellules en quiescences, une forte localisation du récepteur PDGFR α au niveau du cil. Dans ces cellules, le récepteur PDGFR α est phosphorylé en présence de son ligand PDGF-AA, et MEK1/2 situé en aval est aussi phosphorylé. Au contraire du PDGFR α , le PDGFR β se retrouve principalement sous forme de grappe à la surface des cellules, bien qu'une faible fraction semble être localisée au niveau du cil. Les souris *TG737^{orpk}* (homozygote

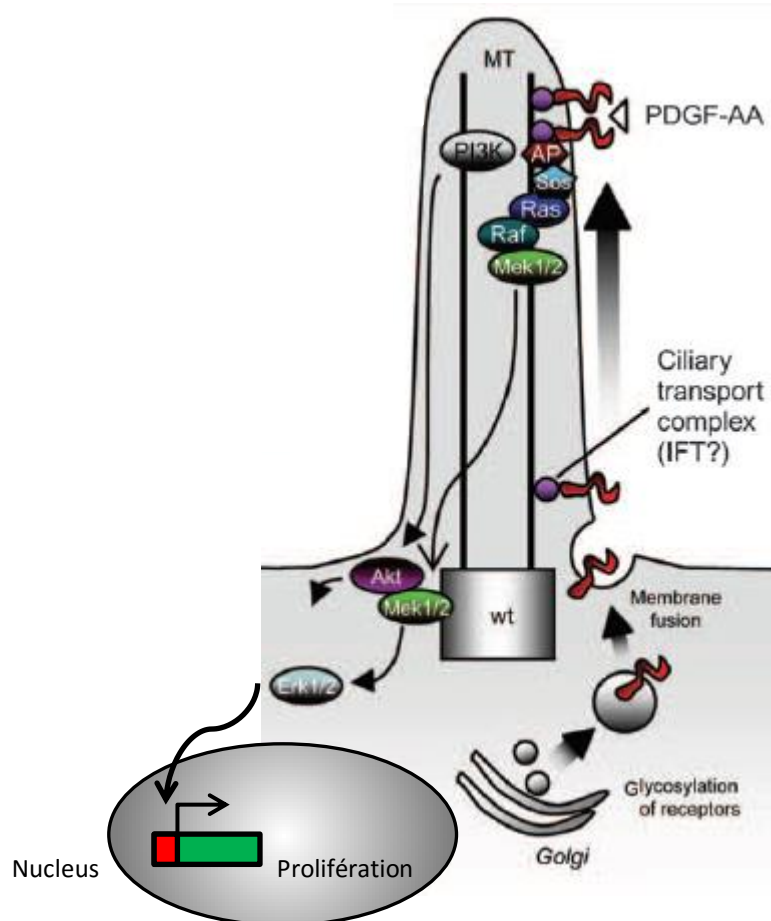


Figure 31 : La signalisation du PDGFR α est régulée au niveau du cil primaire. En présence de son ligand, l'activation du PDGFR α va entraîner une cascade de voies de signalisation dans le cil et/ou au niveau du corps basal comprenant les voies Mek1/2-Erk1/2 et la voie PI3K/Akt conduisant à l'activation de gènes contrôlant l'entrée du cycle cellulaire. *Illustration d'après (Soren T. Christensen et al., 2006).*

pour un allèle hypomorphe d'IFT88) ont un cil de petite taille et présentent une faible réponse au PDGF-AA sans diminution significative de la réponse au PDGF-BB.

Une autre relation potentielle entre le cil primaire et la voie de signalisation du PDGF réside dans leur association avec la migration cellulaire. Les fibroblastes NIH3T3 sont capables de migration par chimiotactisme vers une source de PDGF-AA (Uren et al., 1994). La migration des progéniteurs des oligodendrocytes (O2A) est dépendante du PDGFR α *in vivo* et *in vitro* (Forsberg-Nilsson et al., 1998; Klinghoffer et al., 2002). Ces données tendent à suggérer que le cil pourrait jouer un rôle dans la migration cellulaire. Les cultures de fibroblastes NIH3T3 en migration présentent un cil primaire orienté de façon parallèle à la direction de la migration (Albrecht-Buehler, 1977). Cette observation tend à montrer que si le mécanisme permettant de

détecter et de répondre au PDGF-AA est spécifiquement localisé au niveau du cil primaire, l'orientation de cette structure le long d'un gradient de PDGF-AA peut aider à la détection ou à la réponse de ce gradient (Figure 31).

In vivo, les souris déficientes en PDGF-A et PDGFR α présentent une variété de phénotypes dans lesquels on retrouve, un sévère retard de croissance, une apoptose des cellules dérivées de la crête neurale, des problèmes de prolifération des oligodendrocytes, une séparation anormale des somites, des défauts de fermeture du tube neural, et des problèmes de développement des tissus osseux (Bostrom et al., 1996; Soriano, 1997). Les embryons mutés pour IFT présentent des défauts de développement des tissus pour lesquels la voie de signalisation du PDGF est requise. Cependant, ces phénotypes pourraient être engendrés par une perturbation de la voie Hedgehog qui intervient également dans la croissance embryonnaire, la survie des cellules de la crête neurale, la fermeture du tube neural, le développement des somites et la spécification oligodendrocytaire (Brito et al., 2006; Buttitta et al., 2003; Chiang et al., 1996; Hui and Joyner, 1993; Orentas et al., 1999). Ainsi, la confirmation de la réquisition du cil par la voie de signalisation du PDGF *in vivo* dépendra des contextes conditionnels de perturbation des protéines IFT au cours du développement dans lequel les perturbations de la signalisation Hedgehog auraient peu d'effets.

VII.2 La voie de signalisation Wnt

Notre compréhension actuelle de la voie Wnt est le résultat d'un travail accompli depuis plus de 25 ans démontrant que les protéines wingless (Wg) de la drosophile et Int1 de la souris appartiennent à une famille très conservée de protéines impliquées dans la signalisation (Klaus and Birchmeier, 2008). Peu après, les études ont révélé que la mutation de la protéine effectrice clef, β -caténine, est très présente dans certains cancers (Klaus and Birchmeier, 2008), suggérant que la voie Wnt/ β -caténine est impliquée dans la survie cellulaire et la prolifération (Klaus and Birchmeier, 2008; van Amerongen and Nusse, 2009). Rapidement il a été reconnu que la mise en place de la polarité au cours de la gastrulation requiert un signal paracrine capté par le récepteur transmembranaire Frizzled (Fz) et son effecteur en aval Dishevelled (Dvl) de façon indépendante de la β -caténine. Ensemble, ces résultats ont permis de définir la voie canonique de Wnt (β -caténine dépendante) et la voie non canonique (β -caténine indépendante).

Chez les mammifères, il existe au moins 19 glycoprotéines Wnt sécrétées et 10 récepteurs frizzled (van Amerongen and Nusse, 2009). L'absence de stimulation de la voie canonique Wnt conduit à la dégradation de la β -caténine par un complexe de destruction composé de GSK3 β /Axin2/adenomatosis polyposis coli. Lors de la fixation d'un ligand Wnt à un complexe récepteur composé de Fz et d'une protéine apparentée aux récepteurs des LDL et appelée LRP, Dvl est recruté au niveau de Fz par son domaine PDZ. Cette interaction favorise la polymérisation de ce complexe récepteur et permet la fixation de l'Axin et de la GSK3 β , désassemblant ainsi le complexe responsable de la phosphorylation et la dégradation de la β -caténine. La β -caténine cytosolique peut alors transloquer dans le noyau où elle va, en interaction avec d'autres facteurs de transcriptions (notamment TCF), activer la transcription des gènes cibles.

La voie Wnt non canonique utilise également le complexe récepteur Fz/LRP et Dvl. La distinction majeure que l'on rencontre avec la voie non canonique est l'activation des petites protéines G, JNK, la signalisation calcique et le remodelage du réseau d'actine. La signalisation Wnt la mieux caractérisée est la voie de polarité planaire des cellules (PCP) qui joue un rôle critique dans l'organogenèse chez les vertébrés.

VII.3 Signalisation Wnt et Cil primaire

Les premières études pointant le lien entre le cil primaire et la signalisation Wnt ont décrit une augmentation de l'expression de la β -caténine cytoplasmique dans les cellules épithéliales de rein des souris IFT88^{orp^k} (Cano et al., 2004; Lin et al., 2003). Les auteurs n'ont pas pu expliquer clairement les raisons de cette augmentation de la voie Wnt, ils ont alors fait l'hypothèse que le cil primaire pouvait être impliqué dans la régulation de cette voie. Les travaux ultérieurs sur l'inversin, dont les mutations engendrent un phénotype retrouvé dans de nombreuses ciliopathies, la néphronophtise (NPH) (Hildebrandt et al., 2009), montrent que le complexe Inversin/NPHP2 est localisé à la base du cil primaire et peut réguler négativement la signalisation Wnt canonique tout en potentialisant les cibles non canoniques (Simons et al., 2005). Par des expériences de cotransfections, dans des cellules HEK293, les auteurs ont pu observer que l'inversin bloque l'activation de la construction rapportrice de la voie Wnt canonique médiée par Dvl1, en favorisant la dégradation de la forme cytoplasmique de Dvl. De

façon similaire, la modulation de l'expression d'une autre protéine ciliaire NPHP3 bloque l'activation de la voie Wnt canonique induite par Dvl1 et engendre des problèmes de déplacement des cellules au cours de la gastrulation chez le poisson zèbre (Bergmann et al., 2008). D'une manière générale ces données pointent vers un rôle du cil dans la voie canonique Wnt régulée par Dvl (Figure 32).

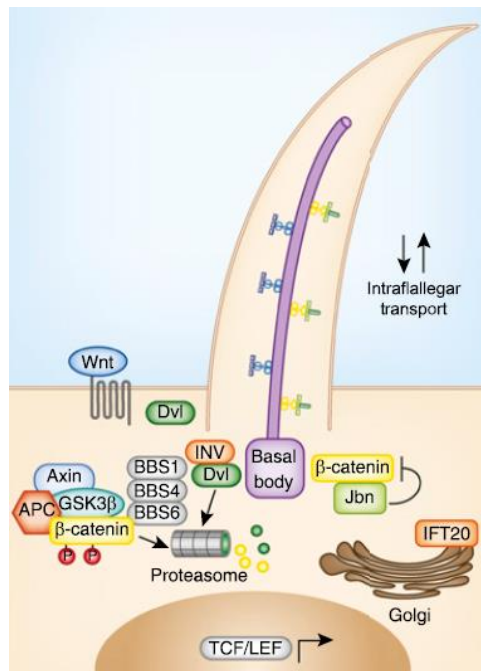


Figure 32 : La signalisation Wnt est régulée au niveau du cil primaire. En condition normale, les protéines BBS participent à la dégradation de la β -caténine par le protéasome. La jouberine (dont les mutations provoque le syndrome de Joubert) peut aussi limiter l'entrée de la β -caténine dans le noyau pour activer le TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor signal transduction). *Illustration d'après (Edwin C. Oh et al., 2013).*

La connexion entre le cil primaire et la voie canonique Wnt a été fortement soutenue par d'autres études. Gerdes et al, ont invalidé BBS1, BBS4 et BBS6 dans des HEK293 exprimant un rapporteur de la voie Wnt (Gerdes et al., 2007). En présence du ligand Wnt3a, les auteurs ont observé une forte activation de la voie Wnt, mesurée par les niveaux du rapporteur luciférase, de la β -caténine et de Dvl. Dans ces mêmes cellules, il apparaît que la déplétion de Kif3a conduit à une hyper activation de la voie Wnt (Gerdes et al., 2007). Ceci renforce la possibilité qu'une fonction du corps basal et du cil pourrait être de contraindre les signaux de la voie Wnt canonique. D'autres études ont rapporté la forte activation de Wnt dans des modèles de souris invalidées pour Kif3a, Ift88 et Odf1 (Corbit et al., 2008). Les auteurs, en générant des embryons

de souris $Kif3a^{-/-}$ exprimant un rapporteur β -galactosidase sous le contrôle de la voie Wnt (BATgal), observent une augmentation de la voie Wnt et du rapporteur dans les régions où l'on retrouve les cellules ciliées. Afin d'examiner si la ciliation des cellules participe à la fonction de Wnt, les auteurs ont isolé les MEFs (mouse embryonic fibroblast) des embryons $Kif3a^{-/-}$ et montrent que la signalisation Wnt est augmentée dans les cellules $Kif3a^{-/-}$ non ciliées. En raison du fait que ces changements de la voie Wnt pourraient être induits par les fonctions non ciliaires de $Kif3a$, les auteurs ont examiné les MEFs homozygotes pour un allèle hypomorphe d'IFT88, qui présentent un cil raccourci, et des cellules souches embryonnaires $Odf1^{-/-}$ qui n'ont pas de cil. Ces deux génotypes présentent une voie Wnt hyperactive engendrée par des perturbations de la fonction du corps basal et du cil primaire.

VII.4 Cil primaire et signalisation Hedgehog

L'importance du cil au cours du développement des vertébrés a été observée dans les expériences de génétiques qui montraient l'importance du cil dans la survie et dans l'arrangement des motifs embryonnaire chez la souris (Huangfu et al., 2003). Les analyses génétiques et biochimiques de ces embryons ont permis de mettre en évidence que ces phénotypes étaient engendrés par des perturbations de la transduction du signal Hedgehog. Ces observations ont soulevé de nombreuses questions, telles que les raisons de sa localisation au niveau du cil, ou pourquoi le cil est requis pour la signalisation Hedgehog des vertébrés, mais ne l'est pas pour celle des invertébrés.

VII.4.1 La voie de signalisation Hedgehog chez les vertébrés est dépendante du transport intraflagellaire

Les études des différents mutants présentant des phénotypes altérés concordant avec ceux engendrés par des perturbations de la voie Hedgehog. Ceci a permis de mettre en évidence que la voie de signalisation Hedgehog dépend du cil primaire. Ces phénotypes présentent d'importants défauts de développement, parmi lesquels on retrouve une perte des cellules ventrales du tube neural, ainsi que des problèmes d'organogenèse (Huangfu et al., 2003). Les gènes atteints dans ces mutants codent pour plusieurs composants du transport intraflagellaire, incluant les protéines du complexe B, IFT172 et IFT88 et DYNC2H1, une sous

unité de la dynéine responsable du transport rétrograde (Huangfu and Anderson, 2005; Huangfu et al., 2003; May et al., 2005). La perturbation de la kinésine-2 dans les embryons *Kif3a*^{-/-} conduit à des défauts similaires du développement du tube neural dépendant de la voie Hedgehog. Les études génétiques ont permis de déterminer que les protéines IFT agissaient au cœur de la signalisation Hedgehog, en aval du récepteur transmembranaire patched 1 (PTCH1) et de *smoothed* (SMO), et en amont des facteurs de transcription Gli (Huangfu and Anderson, 2005; Huangfu et al., 2003).

Le rôle des protéines IFT dans la signalisation Hedgehog est complexe. En l'absence de ligands Hedgehog, les facteurs de transcriptions Gli, par un procédé protéolytique, sont convertis en leur forme répressive (GliRs) qui permet de maintenir inactifs les gènes cibles de la voie Hedgehog. En réponse aux ligands Hedgehog, ce processus de conversion est bloqué permettant l'activation des facteurs de transcriptions Glis (GliA) et des gènes cibles d'Hedgehog. Le transport intraflagellaire est requis pour la production des GliAs et des GliRs (Huangfu and Anderson, 2005; Liu et al., 2005), il en résulte que les mutants IFT montrent une perte des phénotypes Hedgehog dans certains types cellulaires, et un gain dans d'autres. Par exemple, les GliAs ont un rôle central dans le développement, et les mutants IFT présentent une perte de la signalisation Hedgehog dans le tube neural. Au contraire, les GliRs ont un rôle central dans le développement des membres, et les mutants IFT qui survivent jusqu'à des stades tardifs de l'embryogenèse présentent une polydactylie préaxiale, caractéristique de la perte des GliRs (Huangfu and Anderson, 2005; Liu et al., 2005; May et al., 2005).

De récentes études ont pu mettre en avant l'importance du transport intraflagellaire dans la signalisation Hedgehog chez le poisson zèbre. Les mutations pour IFT88 dans cet organisme engendrent des perturbations de la signalisation Hedgehog au niveau du tube neural et des somites (Huang and Schier, 2009). Cependant, les problèmes d'arrangement des motifs embryonnaires engendrés par la perte d'IFT88 chez le poisson zèbre, sont quelque peu différents de ceux observés chez les mammifères. Les souris IFT88 mutées perdent les cellules ventrales du tube neural dépendantes de Sonic Hedgehog (Huangfu et al., 2003) et les poissons zèbres IFT88^{-/-} perdent certaines cellules comme les progéniteurs interneuronaux V3 et les

cellules pionnières musculaires, qui requièrent le plus haut niveau d'activation de la voie Hedgehog. Toutefois, les types cellulaires du tube neural et des somites définis par une faible activation de la voie Hedgehog se sont étendus (Huang and Schier, 2009). Ces contrastes peuvent être dus à un équilibre différent entre les GliAs et les GliRs entre le poisson zèbre et la souris (Huang and Schier, 2009).

VII.4.2 L'importance des protéines du corps basal dans la signalisation Hedgehog

Les protéines du transport intraflagellaire ne sont pas les seules à être importantes pour la voie Hedgehog. De récentes études ont mis en avant le rôle des protéines associées au corps basal. Comme nous avons pu le voir, certaines d'entre elles sont impliquées dans la ciliogenèse. Dans tous les cas analysés jusqu'à présent, ces protéines semblent requises pour la signalisation Hedgehog. Par exemple, la mutation de la *talpid3* a tout d'abord été connue pour engendrer une polydactylie (Ede and Kelly, 1964a, b) et des problèmes de développement en accord avec une perturbation de la voie Hedgehog (Davey et al., 2007; Lewis et al., 1999). Les embryons de souris *talpid3*^{-/-} montrent une incapacité à former un cil, et il a été observé que le gène touché code pour une protéine centrosomale (Yin et al., 2009).

Les mutations affectant d'autres protéines du corps basal telles qu'*OFD1*, *fantom* (FTM, aussi connue sous le nom de *RPGRIP1L*), *MKS1* (meckel syndrome type1 et *ECV* (Ellis-van Creveld syndrome protein)) sont responsables d'une ciliopathie chez l'Homme et affectent la signalisation Hedgehog chez les mammifères. Les souris mutantes pour *OFD1*, *MKS1* ou *FTM*, présentent un cil anormal ou absent et montrent des perturbations de la signalisation Hedgehog proportionnelles à la sévérité des perturbations du cil (Delous et al., 2007; Ferrante et al., 2001; Ferrante et al., 2006; Vierkotten et al., 2007; Weatherbee et al., 2009). *EVC* est une protéine localisée au niveau du corps basal qui est responsable d'une pathologie squelettique : le syndrome d'Ellis-van Creveld (Ruiz-Perez et al., 2000; Ruiz-Perez et al., 2003). Contrairement aux autres protéines du corps basal, l'expression d'*EVC* chez la souris se limite au développement des structures osseuses, et elle ne semble pas importante pour la formation du cil des chondrocytes. Néanmoins, les souris *EVC*^{-/-} présentent une réduction de la signalisation Indian Hedgehog (IHH) spécifiquement au sein des structures squelettiques. C'est pourquoi *EVC* ne

semble pas affecter la ciliogenèse mais est importante dans la signalisation Hedgehog de types cellulaires spécifiques.

VII.4.3 La localisation ciliaire des acteurs de la voie de signalisation Hedgehog

De façon intéressante, tous les acteurs clefs de la voie de signalisation Hedgehog sont enrichis dans le cil primaire.

Les deux protéines transmembranaires, PTCH1 (le récepteur d'Hedgehog) et SMO (qui agit en aval de PTCH1) présentent un déplacement dynamique au niveau du cil suivant l'activation ou non de la voie (Corbit et al., 2005; Rohatgi et al., 2007). En absence de stimulation PTCH1 est présent à la base du cil et SMO n'est pas associé au cil. Lors de l'activation de la voie PTCH1 est exclu de l'espace ciliaire, et SMO se déplace au niveau du cil (Corbit et al., 2005; Rohatgi et al., 2007). Les formes constitutivement actives de SMO conduisent à sa localisation permanente au niveau du cil (Corbit et al., 2005). Malgré l'enrichissement de SMO au niveau du cil en réponse aux ligands Hedgehog, en l'absence de ligands SMO s'accumule aussi dans les cellules invalidées pour la dynéine responsable du transport rétrograde (Kim et al., 2009; Ocbina et al., 2009), ce qui suggère que SMO est adressé au cil de façon constitutive et que l'activation de la voie Hedgehog augmente l'accumulation de SMO dans le cil (Figure 33).

Les facteurs de transcriptions Gli sont aussi enrichis au niveau du cil. En effet, Gli2, dont la fonction première est d'être un activateur transcriptionnel de la signalisation Hedgehog chez les mammifères, et Gli3, qui peut être converti en répresseur transcriptionnel, sont localisés au sommet du cil (Haycraft et al., 2005) (Figure 33). De récentes études montrent un enrichissement de ces deux facteurs au sommet du cil de fibroblastes suite à l'activation de la voie Hedgehog (Endoh-Yamagami et al., 2009; Kim et al., 2009). De plus, l'enrichissement ciliaire de Gli2 au sommet du cil dépend de l'activation de SMO (Kim et al., 2009). Comme SMO, Gli2 s'accumule fortement au niveau du cil dans les cellules invalidées pour Dync2h1 (Kim et al., 2009), ce qui démontre le trafic constant de Gli2 au sein du cil (Figure 33).

La protéine SUFU, un répresseur important de la voie Hedgehog chez les mammifères, est aussi retrouvée au sommet du cil primaire (Endoh-Yamagami et al., 2009; Haycraft et al.,

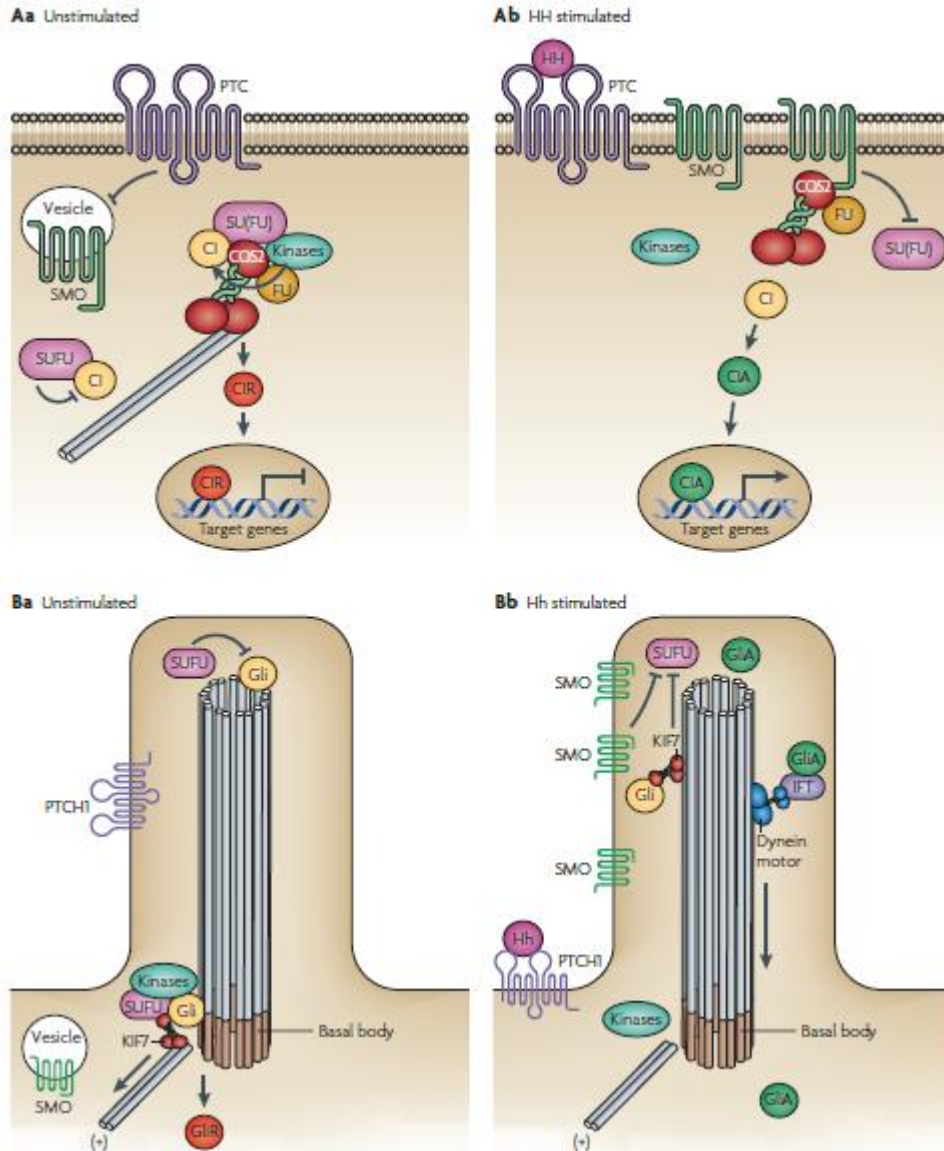


Figure 33 : Localisation des complexes de la voie de signalisation Hedgehog chez *Drosophila melanogaster* et chez les mammifères. (A) Modulation de la structure du complexe protéique chez *D.melanogaster* par Hedgehog (HH). (Aa) En l'absence de ligand, Patched (PTC) empêche la translocation de Smoothened (SMO) à la membrane plasmique. Un complexe associé aux microtubules, composé de Costal 2 (COS2), Fused (FU), le suppresseur de fused (SU(FU)) et Cubitus interruptus (CI) recrute plusieurs kinases comprenant la Protéine kinase A (PKA), Caséine kinase I (CKI) et la Glycogène synthase kinase 3 β qui favorisent la conversion de CI en sa forme répressive (CIR). SU(FU) peut aussi être associé à la forme complète de CI pour empêcher sa translocation au niveau du noyau. (Ab) Lors de l'activation de la voie, SMO se déplace à la membrane plasmique, et le complexe FU-COS2 s'associe avec l'extrémité C-term de SMO permettant le relargage de CI. L'activation de la voie inhibe aussi le régulateur négatif. (B) Dans la signalisation Hh chez les vertébrés, la transduction du signal se fait au sein du cil primaire. (Ba) En l'absence de ligand, PTCH1 est localisé au niveau du cil et bloque l'entrée du cil à SMO. La kinésine KIF7 (homologue de COS2) est localisée à la base du cil, où elle forme un complexe avec les protéines Gli. KIF7 à la base du cil empêche l'accumulation des Gli dans le cil et favorise la formation des GliRs. (Bb) Après l'activation de la voie, SMO se déplace au niveau de la membrane ciliaire et KIF7 est relocalisée dans le cil, engendrant une accumulation de Gli2 au sommet du cil. KIF7 au sommet du cil peut aussi bloquer la fonction de SUFU. Les Gli activés sont transportés en dehors du cil par le transport intraflagellaire. Illustration d'après Sarah C. Goetz et al., 2010.

2005). SUFU a la capacité d'inhiber Hedgehog, malgré l'absence de cil (Chen et al., 2009; Jia et al., 2009). Cependant, une délétion partielle de SUFU engendre une activation de la voie

seulement dans les cellules ayant un cil primaire fonctionnel (Ocbina and Anderson, 2008), soulignant le rôle complexe de SUFU dans le cil. Bien que la relation entre SUFU et le cil reste à définir, les données sont en accord avec le modèle dans lequel SMO active Hedgehog au sommet du cil en inhibant l'activité de SUFU, ce qui conduit à l'activation des facteurs de transcriptions Gli.

VII.4.4 Le transport intraflagellaire régule la voie de signalisation Hedgehog dans le cil

Le cil primaire semble important pour la voie de signalisation Hedgehog chez les mammifères, puisqu'il permet, tout simplement, de fournir un environnement dans lequel les composants de la voie sont enrichis, facilitant ainsi leurs interactions. Toutefois, la relocalisation dynamique des composants de la voie en présence du ligand suggère que le transport des protéines de la voie Hedgehog requiert l'implication du transport intraflagellaire.

Les lignées de souris invalidées pour les protéines du complexe B du transport intraflagellaire perdent le cil et toutes les réponses aux ligands Hedgehog (Houde et al., 2006; Huangfu et al., 2003; Liu et al., 2005). Au contraire, les mutations des protéines du complexe A permettent la formation du cil (avec une morphologie anormale), engendrent des phénotypes développementaux très différents des souris incapables de former un cil qui semblent être provoquées par l'activation de la voie Hedgehog plutôt que par sa perte. Les souris mutées pour les deux protéines du complexe A, IFT139 et IFT122, présentent une expansion des cellules de type neural dépendantes de la signalisation Hedgehog, et une augmentation de l'expression de ses gènes cibles (Cortellino et al., 2009; Huangfu et al., 2003; Stottmann et al., 2009).

Les phénotypes opposés des souris invalidées pour les protéines du complexe A et du complexe B sont intéressantes. En effet, à la fois DYNC2H1 et les protéines du complexe A sont

importantes pour le transport rétrograde, mais la perte des protéines du complexe A engendre une augmentation de la signalisation Hedgehog (Cortellino et al., 2009; Tran et al., 2008), alors que les mutations de DYNC2H1 bloquent la réponse aux ligands Hedgehog (Huangfu and Anderson, 2005; May et al., 2005). Ces résultats suggèrent que la perte des protéines du complexe A pourrait perturber de différentes façons le trafic ciliaire des composants de la voie Hedgehog permettant ainsi d'expliquer cette diversité de phénotypes. Enfin comme nous l'avons vu précédemment, Smo est capable de se déplacer latéralement de la membrane plasmique à la membrane ciliaire (Milenkovic et al., 2009), c'est pourquoi il serait particulièrement intéressant d'étudier le déplacement de Smo dans des modèles invalidés pour les protéines du complexe A.

VII.4.5 Le rôle de Kif7

Bien que très conservé chez les mammifères, le cil n'est pas requis pour la signalisation Hedgehog chez *D. melanogaster*. Afin d'expliquer cette différence, de récents travaux ont pu mettre en avant le rôle de Kif7, une kinésine homologue chez les vertébrés de COS2 chez *D. melanogaster*.

COS2 est un composant clef de la signalisation Hedgehog chez la drosophile, régulé par la sérine/thréonine kinase Fused (FU). COS2 a une double fonction dans la voie :

- elle permet, en absence de ligand Hedgehog, la formation d'un complexe COS2/FU/(SU)FU/CI relié aux microtubules. L'association de ces protéines permet de recruter différentes kinases au niveau de ce complexe telles que la PKA, ou la GSK3 β qui vont induire la formation de la forme répressive de CI (CIR) conduisant à l'inhibition de la signalisation Hedgehog (Figure 33).
- suite à l'inhibition de Patch, SMO est relocalisé au niveau de la membrane plasmique ce qui permet au complexe FU/COS2 d'interagir avec SMO provoquant la libération de CI ce qui aboutit à l'activation des gènes cibles de la voie (Aikin et al., 2008; Sisson et al., 1997; Wang et al., 2000) (figure 33).

Bien que COS2 puisse interagir avec les microtubules, au cours de l'évolution sa séquence d'acides aminés a divergé par rapport à celle des autres kinésines, de telle sorte qu'elle n'est plus capable de se déplacer (Farzan et al., 2008).

Chez la souris ou le poisson zèbre, de récents travaux ont décrit le rôle de Kif7 dans la régulation de la signalisation Hedgehog (Cheung et al., 2009; Endoh-Yamagami et al., 2009; Liem et al., 2009; Tay et al., 2005). Contrairement à COS2, son homologue chez les vertébrés Kif7 est tout à fait capable de se déplacer le long des microtubules. En absence de ligands Hedgehog, la localisation de Kif7 est restreinte à la base du cil primaire et se déplace au sommet du cil suite à l'activation de la voie (Endoh-Yamagami et al., 2009; Liem et al., 2009). Ce déplacement de Kif7 le long du cil suggère qu'elle puisse faire partie du transport antérograde (Liem et al., 2009).

L'étude publiée par le laboratoire de Kathryn V. Anderson a pu révéler le rôle de Kif7 dans l'exclusion de Gli2 de l'espace ciliaire lorsque la signalisation Hedgehog est inactive. Enfin, le déplacement de Kif7 au sommet du cil contribue à l'activation de la voie suite à l'inhibition du récepteur Patched (Liem et al., 2009) (Figure 33). Récemment, il a été montré que ce déplacement de Kif7 apparaît également important pour la stabilisation de l'axonème, ainsi que pour le contrôle de la taille du cil. En effet, l'équipe de Kathryn V. Anderson a pu mettre en avant que la perte de fonction de Kif7 dans des fibroblastes embryonnaires de souris engendrait une élongation du cil (He et al., 2014).

VIII Cil primaire et obésité

Comme nous l'avons vu, la forte implication du cil dans plusieurs voies de signalisations, lui attribue un rôle de premier plan au cours du développement. Les pathologies génétiques affectant des protéines importantes du cil (ciliopathies) conduisent à des désordres développementaux dans un premier temps, mais peuvent aussi engendrer une obésité. Un certains nombres d'études ont pu lier le développement de l'obésité dans certaines ciliopathies à des perturbations du contrôle de l'homéostasie énergétique par l'hypothalamus et des dérèglements de l'adipogenèse. Au cours de cette partie nous analyserons en quoi les perturbations du cil primaire contribuent à ce développement excessif du tissu adipeux (Fig 33).

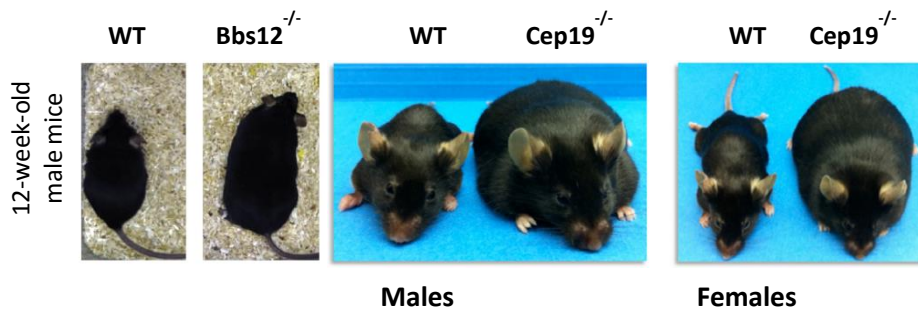


Figure 34 : Modèles de souris invalidées pour des protéines associées au cil entraînant une obésité. (Bbs12^{-/-}) d'après Vincent Marion et al., 2012 ; (Cep19^{-/-}) d'après (Adel Shalata et al., 2013).

VIII.1 Cil et ciliopathies

L'identification des mutations des gènes codants pour des protéines du corps basal chez les patients atteints du syndrome de Bardet-Biedl ont mis en évidence pour la première fois les répercussions des perturbations du cil primaire sur le contrôle de l'homéostasie énergétique (Ansley et al., 2003). Depuis, plus de 50 loci ont été associés à plus de 15 ciliopathies comme, notamment, la néphronophthie (NPHP), le syndrome de Joubert (JBTS), le syndrome de Bardet Biedl (BBS), le syndrome de Meckel-Gruber (MKS), le syndrome d'Alström (ALMS), le syndrome de Jeune (JATD) (Valente et al., 2014). Bien qu'individuellement rare, la prévalence cumulée de ces différentes ciliopathies s'élève à plus de 1 pour 1000 naissances (Zaghloul and Katsanis, 2009).

Les ciliopathies les plus étudiées, BBS et ALMS, présentent des pathologies communes telles que : l'obésité, une dégénérescence rétinienne, une infertilité, et des pathologies dont la pénétrance est plus faible comme le diabète de type II et la résistance à l'insuline, ce dernier symptôme se manifeste tôt chez les patients ALMS et tard, voir jamais chez les patients BBS (Feuillan et al., 2011). Avec les gènes BBS, 20 gènes ont été décrits comme reliés au syndrome de Bardet-Biedl (Lindstrand et al., 2014) alors que seule la mutation du gène ALMS1 semble être responsable du syndrome ALMS (Marshall et al., 2011). Contrairement à IFT88 ou Kif3a, la perte de fonction du gène ALMS1 ou des gènes BBS n'engendre pas la perte du cil primaire, mais une perturbation de l'homéostasie des voies de signalisations qui y siègent (Oh and Katsanis, 2012). Les souris mutées pour les gènes ALMS1 ou BBS présentent les mêmes caractéristiques cliniques que les patients (Oh and Katsanis, 2012). En parallèle, la présence du cil dans un certain nombre de sites comme les progéniteurs adipogéniques et myogéniques et au niveau

des neurones orexigéniques et anorexigéniques (Marion et al., 2009; Przybylski, 1971), suggère un lien direct entre ces sites et l'obésité induite dans les ciliopathies.

VIII.2 Le rôle du cil primaire dans l'hypothalamus

Le noyau arqué localisé au niveau du plancher du troisième ventricule hypothalamique contrôle un ensemble de processus neuroendocrinien, dont la régulation du comportement alimentaire et la régulation de la dépense énergétique. On distingue deux populations de neurones ciliés au niveau du noyau arqué :

- Les neurones orexigéniques, qui favorisent la prise alimentaire, et expriment les neuropeptides Y (NpY) et AgRP (agouti-related peptide) (Broberger et al., 1998; Hahn et al., 1998)
- Les neurones anorexigéniques diminuent la prise alimentaire, et expriment les neuropeptides POMC (pro-opiomelanocortin) et CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) (Elias et al., 1998)

Ces deux populations de neurones sont sensibles à la leptine et à l'insuline. La présence de leptine inhibe les neurones orexigéniques et active les neurones anorexigéniques. L'interaction de la leptine avec son récepteur conduit à l'activation de STAT3 par phosphorylation (Friedman and Halaas, 1998; Vaisse et al., 1996) ce qui induit une augmentation de la transcription de POMC et diminue l'expression de NpY dans ces neurones (Ernst et al., 2009; Mesaros et al., 2008).

Afin de déterminer l'implication du cil dans le comportement alimentaire, une ablation du cil chez des souris adultes a été réalisée en utilisant un système de délétion inducible au tamoxifène contre IFT88 ou Kif3a (Davenport et al., 2007). Cette totale ablation de Kif3a ou IFT88 conduit à une obésité induite par un comportement hyperphagique, une hyperleptinémie et des niveaux d'insuline et de glucose élevés. Les souris Kif3a^{-/-} soumises à un régime contrôlé ne développent pas d'obésité ou de niveaux élevés de leptine ce qui suggère qu'une perturbation du cil primaire peut conduire à une dérégulation du comportement alimentaire (Davenport et al., 2007). L'invalidation spécifique de Kif3a ou d'IFT88 dans les neurones conduit

aux mêmes phénotypes que ceux observés dans les souris *Kif3a*^{-/-} traitées au tamoxifène (Davenport et al., 2007). Ces résultats mettent en avant le rôle des protéines ciliaires dans le développement de l'obésité. Cependant aussi bien *Kif3a* qu'*IFT88* interviennent dans le transport cytoplasmique. De ce fait, les preuves indiquant que ce soit la perturbation directe du cil primaire au niveau des neurones du noyau arqué restent à déterminer.

La leptine a un rôle de premier plan dans la régulation de la prise alimentaire. Cependant on ne sait pas si la résistance à la leptine est une cause ou une conséquence de l'obésité. Cette perte de sensibilité a été décrite comme responsable du développement de l'obésité chez les souris *BBS2*^{-/-}, *BBS4*^{-/-} et *BBS6*^{-/-} qui présentent toutes une hyperleptinémie (Rahmouni et al., 2008). De plus, on observe dans ces souris une diminution de POMC au niveau de l'hypothalamus ce qui indique la perte de la capacité de la leptine à activer la transcription de ce neuropeptide (Rahmouni et al., 2008). Les défauts de localisation du récepteur de la leptine (*LepR-b*) renforcent l'hypothèse de la contribution de la leptine dans l'apparition de l'obésité observée dans ces modèles. Enfin, la mauvaise localisation de *LepR-b* dans de grandes vésicules cytoplasmiques dans les souris invalidées *BBS1*^{-/-} ou *BBS2*^{-/-}, engendrant la perte de leur interaction avec le récepteur de la leptine, et le fait qu'il soit observé au niveau du cil des cellules épithéliales olfactives (Baly et al., 2007), suggère que celui-ci pourrait être adressé au cil primaire grâce à l'intervention du BBSome (Seo et al., 2009) (Figure 35).

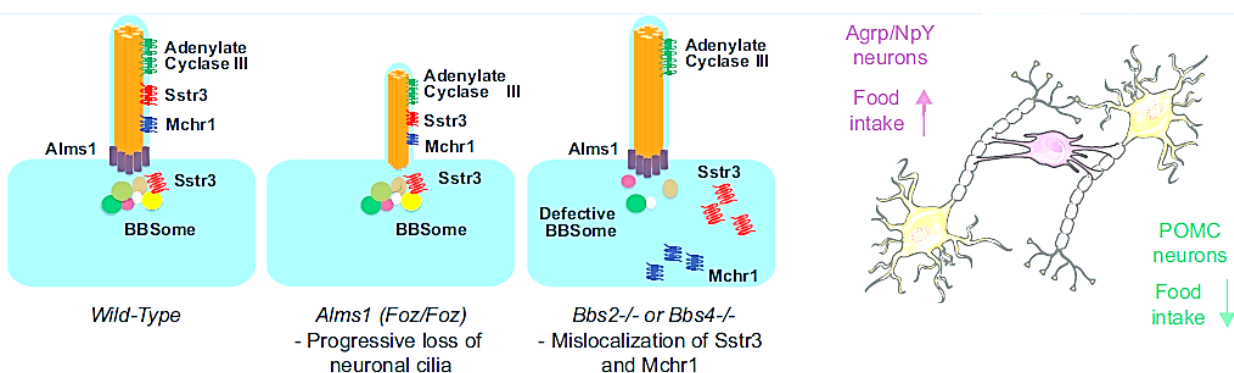


Figure 35 : Rôle du cil primaire dans l'hypothalamus. L'insuline, la leptine, et potentiellement d'autres facteurs n'étant pas caractérisés pour le moment régulent l'activité des neurones de l'hypothalamus, sensibles à la perte du cil primaire. *Illustration d'après (Edwin C. Oh et al., 2014).*

VIII.3 Résistance à la leptine et obésité dans les ciliopathies

Bien que les données fournies par les souris Kif3a^{-/-} et IFT88^{-/-} soulignent l'implication du cil primaire des cellules du noyau arqué, dans l'homéostasie énergétique, la fonction du cil dans le contrôle de la voie de la leptine restent inexpliquées. De récentes études ont examiné le rôle du cil et de la signalisation de la leptine en se basant sur un modèle de souris invalidé pour IFT88 (IFT88^{Δ/Δ}) par une induction au tamoxifène à l'âge adulte (8 semaines) (Berbari et al., 2013). Suite à la perte d'IFT88, l'absence de gain de poids persiste pendant 3 semaines (phase maigre). Bien qu'une alimentation à volonté engendre une obésité à 3 mois chez ces souris, lorsqu'elles sont soumises à une restriction calorique, les souris retrouvent un poids normal à l'âge de 5 mois. En se basant sur l'évolution de leur poids, les souris ont été classées par catégorie de façon chronologique : maigre, obèse et maigre, suite à l'administration du tamoxifène. Au cours des deux premières phases, on observe un niveau élevé de leptine lors de la phase maigre et un pic lors de la phase obèse. D'une façon intéressante, on observe chez ces souris un retour à la normale de la leptinémie lors de la deuxième phase maigre. De plus, l'activation de STAT3 suite à l'administration de leptine au cours de la première phase maigre suggère que la perte du cil ne perturbe pas la signalisation de la leptine dans l'hypothalamus. De façon similaire, l'administration de leptine dans des souris préobèses BBS4^{-/-} engendre une anorexie (Berbari et al., 2013). Ce constat divergent de précédentes observations effectuées à partir de souris BBS2^{-/-} BBS4^{-/-} et BBS6^{-/-}, dans lesquelles le niveau de leptine à l'âge de 5-6 semaines était significativement plus élevé (Rahmouni et al., 2008). L'administration de leptine pendant 4 jours ne permet pas d'induire une perte de poids dans les souris invalidées pour les gènes BBS (Rahmouni et al., 2008), alors qu'elle conduit à une diminution de la prise alimentaire dans les souris BBS4^{-/-} et IFT88^{Δ/Δ} obtenues à partir de travaux similaires (Berbari et al., 2013). La différence entre ces études est difficilement explicable. Le fait qu'elles aient été réalisées à partir de souris de fonds génétiques différents pourrait perturber les paramètres expérimentaux affectant les phases préobèses et obèses. Ces investigations nécessiteraient d'être approfondies. Plus récemment, il a été proposé que le défaut de localisation des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) présente normalement au niveau du cil puisse être responsable de l'obésité engendrée par une hyperphagie dans les modèles BBS (Santos-

Carvalho et al., 2013). L'étude des GPCR ciliaires a permis de designer le récepteur (NPY2R) du NpY comme candidat anoréxigénique défectueux dans la signalisation hypothalamique des souris invalidées pour les protéines BBS (Mukhopadhyay et al., 2010; Sun et al., 2012). En effet, ces souris montrent une insensibilité au PYY3-36, un ligand endogène de NPY2R, suggérant que la localisation des GPCR ciliaires puisse contrôler, ou moduler le phénotype obèse dans les ciliopathies (Loktev and Jackson, 2013).

Ces observations suggèrent qu'indépendamment du fait que la signalisation de la leptine soit sous l'influence de mécanismes ciliaires, la perte du cil des neurones POMC conduit à une obésité chez la souris. Puisque la phosphorylation de STAT3 est induite par la leptine, on peut alors estimer que le cil primaire n'est pas requis pour induire une réponse à la leptine dans les souris IFT88^{Δ/Δ}. L'ensemble de ces résultats montre que la voie de la leptine est sous l'influence de mécanismes ciliaires et non ciliaires, qui ensemble, régulent l'homéostasie énergétique.

VIII.4 Cil primaire et sécrétions pancréatiques

Le pancréas est un organe endocrinien important dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. La fonction endocrine est assurée par les îlots de Langerhans disséminés dans le pancréas, composés des cellules α , β , γ , δ et ϵ qui sécrètent respectivement le glucagon, l'insuline, le polypeptide pancréatique, la somatostatine et la ghréline (Collombat et al., 2010). L'insuline qui est sécrétée en réponse au glucose, est l'un des régulateur clefs dans l'homéostasie énergétique (Collombat et al., 2010). Les pathologies pancréatiques sont particulièrement fréquentes dans les ciliopathies, où l'on retrouve, la plupart du temps des kystes pancréatiques originaires des cellules des canaux chez les patients atteints de polycystiques dominantes ou récessives rénales et dans le syndrome de von Hippel-Lindau, ainsi que dans d'autres ciliopathies (Figure 36). On y rencontre aussi bien des problèmes exocrines sévères que des problèmes endocrines moyens tels qu'une diminution de la tolérance au glucose et une hypoglycémie à jeun (Zhang et al., 2005). Les souris invalidées pour Kif3a spécifiquement au niveau pancréatique présentent une fibrose et une lipomatose pancréatique (Cano et al., 2006). Afin d'évaluer l'implication du cil dans le développement des îlots pancréatiques, Kif3a a été éliminé chez des embryons de souris à 10 jours de vie embryonnaire,

et chez des souris âgées de 4 semaines. Un développement normal du pancréas a été observé suggérant que la régulation des sécrétions hormonales et que la formation des îlots ne sont pas liés (Cano et al., 2006). Bien que la plupart des modèles ciliopathiques invalidés pour les protéines IFT présentent une dilatation des canaux pancréatiques et des kystes, aucun changement dans la sécrétion de l'insuline n'a été observé (Figure 36). Néanmoins de récentes études ont établi chez des souris $BBS4^{-/-}$ et $BBS6^{-/-}$ que la phase diabétique précède l'apparition de l'obésité (Gerdes et al., 2014). Ces souris ne présentent pas de défaut du développement des îlots pancréatiques bien qu'ils soient moins présents et que la proportion de cellules ciliées y est plus faible. Bien que ces souris ne présentent pas de différences insulinémiques significatives, le premier pic de sécrétion d'insuline n'est pas observé suite à l'injection de glucose. Cette différence n'est due ni à un défaut de production d'insuline, ni à une incapacité de sécrétion

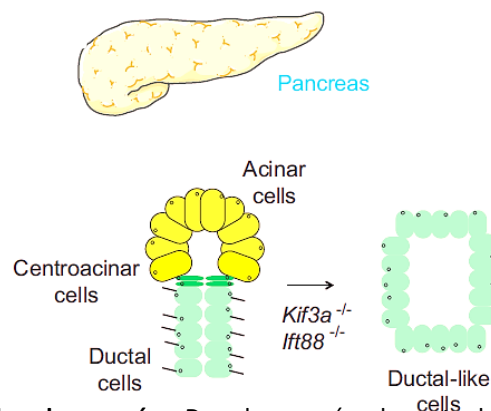


Figure 36 : Rôle du cil primaire dans le pancréas. Dans le pancréas, la perte des protéines IFT engendre la transformation des cellules acinaires centrales en cellules canalaire. *Illustration d'après (Edwin C. Oh et al., 2014).*

puisque le traitement au KCL de ces îlots conduit à une libération d'insuline ne différant pas des îlots de souris saines. De plus, une étude approfondie a permis de montrer le recrutement de l'isoforme A du récepteur à l'insuline au niveau du cil primaire des cellules β pancréatiques saines suite à une stimulation à l'insuline. Enfin l'invalidation de $BBS4$ ou d' $Odf1$ dans les cellules β pancréatiques conduit à une diminution de la phosphorylation d'Akt (Kaneko et al., 2010). L'ensemble de ces données tend à montrer l'implication du cil dans la sécrétion et la sensibilité à l'insuline des patients atteints de ciliopathies.

VIII.5 Cil primaire et adipocyte

Au-delà de l'implication du cil dans le contrôle de la signalisation de la leptine hypothalamique, la perturbation du système nerveux central n'est pas la seule cause pouvant induire une obésité dans les ciliopathies. Les adipocytes matures sont parmi les rares cellules de l'organisme connues pour ne pas être ciliées (Marion et al., 2009). Cependant, au cours de la différenciation adipocytaire, le cil primaire est présent. Afin d'évaluer la pertinence de ce cil transitoire, des analyses transcriptomiques ont été réalisées pendant l'adipogenèse. Ces analyses ont révélé une augmentation significative de l'expression des gènes BBS1 à BBS4 et BBS6 à BBS12 lors de la différenciation (Forti et al., 2007; Marion et al., 2009). Par la suite, BBS10 et BBS12 ont été supprimées dans des progéniteurs adipeux primaires en confluence, et cultivées en milieu adipogénique. Deux jours après ce traitement, on détecte une augmentation de l'expression de PPAR γ suggérant que le cil régulerait de façon négative la différenciation adipogénique. Cette étude est contredite par les précédentes qui montraient que la suppression d'Alms1 ou des protéines IFT conduisait à une diminution de PPAR γ dans les cellules 3T3-L1 (Huang-Doran and Semple, 2010). Cependant, du fait que les progéniteurs adipeux humains peuvent se différencier en adipocytes matures sans passer par une étape de mitose post-confluence, comme c'est le cas des 3T3-L1, les variations de PPAR γ peuvent être attribuées aux différences entre ces lignées.

Le processus par lequel les progéniteurs adipeux se différencient en adipocytes matures est sous le contrôle de la voie de signalisation Wnt. L'inhibition de cette voie favorise la différenciation et l'activation de l'adipogenèse (Ross et al., 2000; Wright et al., 2007). *In vivo*, ces observations ont été appuyées par des travaux montrant que les souris^{ob/ob} exprimant Wnt10b sous le contrôle d'aP2 connaissent une réduction de 50% de leur poids (Longo et al., 2004; Wright et al., 2007). Comme on pouvait le prévoir, les souris invalidées pour Wnt10b présentent une augmentation de leur potentiel adipogénique confirmant ainsi l'implication de la voie Wnt dans le contrôle de l'adipogenèse (Vertino et al., 2005). Afin d'identifier l'implication des protéines associées au corps basal lors de la différenciation adipocytaire, une invalidation par siRNA des protéines BBS10 et BBS12 a été réalisée. Ces expériences ont abouti à une

augmentation de l'expression de PPAR γ et de la forme active de la GSK3 β (Marion et al., 2009) Figure 37). De plus les adipocytes générés à partir de progéniteurs adipeux de patients mutés pour l'une de ces deux protéines, montrent une augmentation significative de leur contenu en triglycérides ainsi qu'une capacité plus importante à sécréter de la leptine dans le milieu. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'adipogenèse est une conséquence directe de la perte des protéines associées au corps basal chez les patients atteints de ciliopathies.

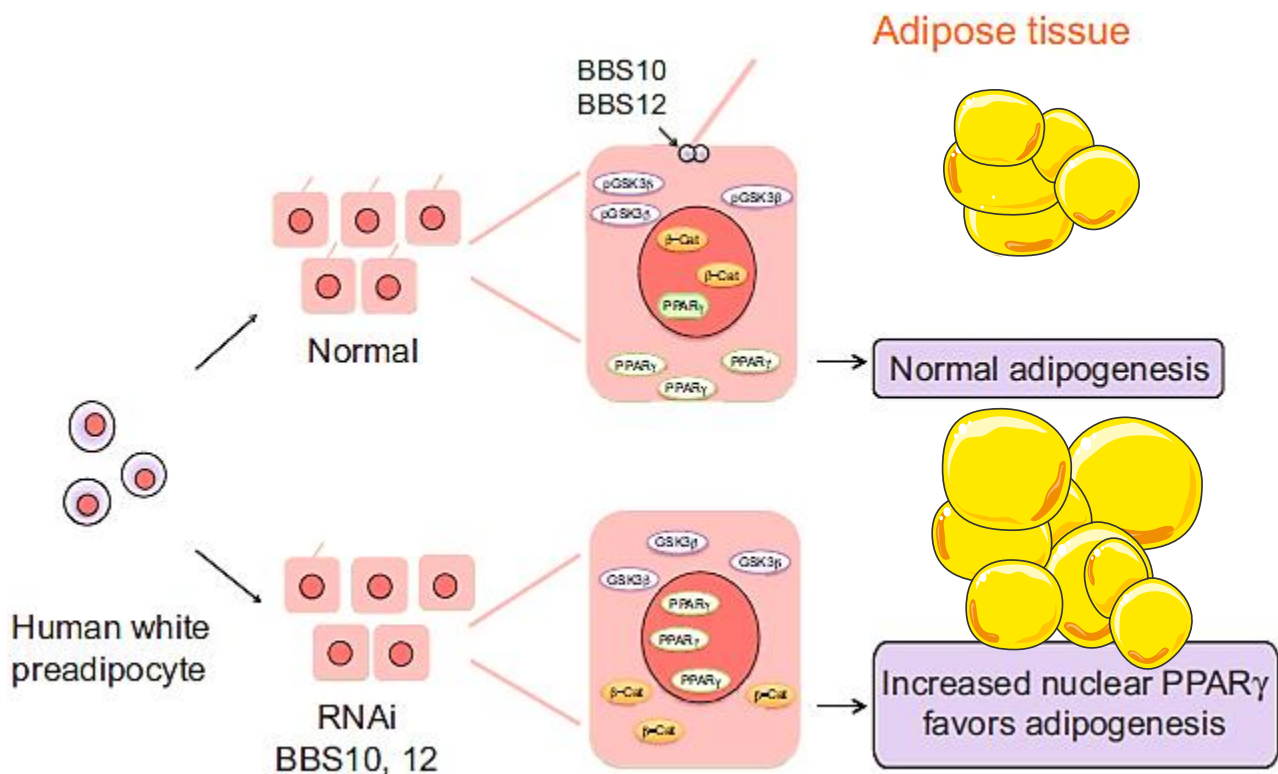


Figure 37 : Rôle du cil primaire dans le tissu adipeux. Dans le tissu adipeux, la perte des protéines BBS engendre la perte du cil des progéniteurs adipeux ; leur incapacité à répondre à leur environnement extracellulaire conduit à la perturbation de la différenciation adipocytaire. *Illustration d'après Edwin C. Oh et al., 2014.*

Comme nous l'avons vu, le cil primaire apparait comme étant le centre régulateur des voies de signalisations Wnt et Hedgehog, qui sont toutes les deux décrites pour être antiadipogénique. Afin d'analyser l'implication du corps basal dans la signalisation Hedgehog au cours de l'adipogenèse, des études de suppression de BBS12 ont été réalisées sur des adipocytes dérivés de cellules souches mésenchymateuses humaines (Marion et al., 2012). L'ensemble de ces résultats a pu montrer une augmentation de PPAR γ au cours de la différenciation, ainsi qu'une diminution de l'expression de Gli2 et Gli3 plus importante dans les

cellules après quatre jours de différenciation. Ces résultats montrent que la perte des protéines du corps basal engendre une répression du programme antiadipogénique. Afin de valider ces résultats *in vivo*, des souris BBS12^{-/-} ont été générées. En accord avec les études *in vitro*, et les modèles de souris BBS4^{-/-}, une perte de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline a été observé (Marion et al., 2012). Enfin, les expériences de nutrition contrôlée réalisées chez les souris BBS2^{-/-} et BBS4^{-/-} ont révélé un développement du tissu adipeux deux fois plus important que chez les souris sauvages (Rahmouni et al., 2008).

L'autophagie est un processus de dégradation qui permet à la cellule de recycler ses composants cellulaires (Pampliega et al., 2013; Tang et al., 2013). L'activation de l'autophagie se produit généralement au cours de carences alimentaires, mais aussi au cours du développement et de la différenciation (Jing and Lim, 2012). De plus, le lien entre l'autophagie et la ciliogenèse est important, et de nombreuses protéines impliquées dans le processus autophagique ont une localisation associée à l'axonème (ATG16L, AMBRA1, LC3, GABARAP, VPS15) et au niveau du corps basal (ATG16L, AMBRA1, LC3, GABARAP, VPS16, ATG14, VPS34, ATG7 et ATG5) (Pampliega et al., 2013). L'invalidation spécifique d'ATG7 dans le tissu adipeux engendre une forte perte du tissu adipeux, ainsi qu'une hypersensibilité à l'insuline (Zhang et al., 2009b).

En conclusion, le cil est fortement impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique, que ce soit sur le contrôle du comportement alimentaire ou au niveau du contrôle de la différenciation adipocytaire. Néanmoins, on ne peut pas conclure catégoriquement que la fonction du cil soit directement requise dans le maintien du poids. De plus, bien que les protéines ciliaires puissent être liées à l'obésité mécaniquement dans les syndromes génétiques, on ne connaît pas leurs implications dans les formes communes de l'obésité.

Résultats

Au cours des parties précédentes, nous avons vu l'importance du cil primaire dans le développement et dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. De façon étonnante, l'adipocyte est l'un des seuls types cellulaires à ne pas être cilié, ce qui n'est pas le cas du progéniteur adipeux (Marion et al., 2009). Bien que les études réalisées à partir des progéniteurs ou des modèles de souris invalidées pour les protéines BBS montrent un lien entre le cil primaire et la différenciation adipocytaire, aucunes de ces études n'expliquent les raisons de sa perte ou ses conséquences. De façon parallèle, le laboratoire a observé la perte de la voie antiadipogénique Hedgehog dans les adipocytes (Fontaine et al., 2008) ; il en est de même pour la voie Wnt (Yuan et al., 2015). Au cours de nos études, nous avons donc voulu comprendre, dans un premier temps, quelles étaient les étapes précédant la perte du cil, et à quel moment cette perte se produisait. L'analyse précise du cil primaire au cours de la différenciation adipocytaire nous a permis d'observer que le cil subissait différentes modifications lors de ce processus. Au cours des premiers jours de différenciation le cil subit une importante phase d'élongation, suivie d'une phase de rétractation, et n'est plus présent dans les cellules fortement différenciées remplies de lipides. La signalisation Hedgehog semble particulièrement impactée par ces changements, puisqu'après trois jours de différenciation, les cellules présentent une résistance au ligand SHH.

Par la suite, nous avons cherché à déterminer les raisons de la perte du cil au cours de l'adipogenèse. Pour cela nous avons analysé le rôle de la protéine HDAC6 pendant la différenciation. De façon intéressante, cette protéine a été décrite pour être impliquée dans les situations biologiques où il y a perte du cil comme la mitose (Pugacheva et al., 2007), le choc de chaleur (Prodromou et al., 2012) et certains cancers (Gradilone et al., 2013).

I. HDAC6

HDAC6 est une des déacétylase de classe II régulant de nombreux processus biologiques. HDAC6 dispose de fonctions, à la fois cytoplasmiques et nucléaires. Contrairement aux autres déacétylases, HDAC6 a une spécificité pour d'autres substrats que les histones. Les différentes

fonctions d'HDAC6 font de cette protéine une cible thérapeutique intéressante dans un certain nombre de pathologies comme le cancer (Aldana-Masangkay and Sakamoto, 2011).

L'acétylation des résidus lysines est une modification post-transcriptionnelle réversible qui influence de nombreux processus cellulaires comme le remodelage de la chromatine, la signalisation, l'épissage de l'ARN, l'expression génique, le cycle cellulaire, la stabilité des protéines et leurs transports (Zhang et al., 2009a). La déacétylation de la lysine est un processus dynamique réversible régulé par la compétition entre deux familles d'enzymes, les histones *acétyltransférases* (HAT) et les histones déacétylases (HDAC). Bien que l'acétylation des histones ait été principalement étudiée dans le cadre de la structure de la chromatine et de l'expression génique, une étude récente, réalisée à partir d'une approche protéomique, a montré l'existence de plus de 3600 sites d'acétylations dans environ 1750 protéines nucléaires et non-nucléaires, comparé au phosphoprotéome avec 6600 sites de phosphorylation dans environ 2200 protéines (Choudhary et al., 2009).

Parmi les 18 protéines HDAC chez les mammifères, HDAC6 est une déacétylase cytoplasmique de classe II unique, capable de désacétyler des substrats tels que la tubuline, Hsp90, et la cortactine (Bertos et al., 2004; Verdel et al., 2000). HDAC6 possède deux sites catalytiques et un domaine de doigts de zinc (appelé BUZ) à son extrémité C-terminale, capable de fixer l'ubiquitine libre aussi bien que les protéines mono- et poly-ubiquitinées avec une forte affinité (Boyault et al., 2006; Hook et al., 2002; Seigneurin-Berny et al., 2001). HDAC6 est localisée principalement dans le cytoplasme où elle exerce son activité de déacétylase sur la tubuline de façon dépendante des microtubules via un mécanisme dépendant et indépendant de son activité enzymatique (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Zhang et al., 2003). Du fait de cette interaction, HDAC6 régule de multiples processus cellulaires tels que, la diffusion cellulaire, la migration cellulaire, la formation de la synapse immunitaire, la dégradation des protéines mal repliées, le désassemblage du cil primaire à travers diverses interactions avec ses partenaires. Les souris HDAC6^{-/-} sont viables et ont un niveau de tubuline acétylée élevé dans différents organes. Elles présentent une réponse immunitaire modérée et une légère augmentation de la densité osseuse (Zhang et al., 2008).

I.2 HDAC6 : Structure et localisation cellulaire

Les HDAC de classe I sont localisées exclusivement au niveau du noyau, alors que les HDAC de classe II sont des protéines plus larges que l'on retrouve au niveau du cytoplasme et du noyau (Fischle et al., 2001). HDAC6 est principalement retrouvée dans le cytoplasme à cause de sa séquence signal d'export nucléaire (NES) en N-term et son motif SE14, située après le deuxième site catalytique, qui l'ancre au cytoplasme (Bertos et al., 2004; de Ruijter et al., 2003) (Figure 38). Dans les cellules quiescente, on retrouve une faible fraction de cette protéine au niveau du noyau grâce à sa séquence signal de localisation nucléaire (NLS) en N-term (Verdel et al., 2000).

HDAC6 est composée de 1215 acides aminés, ce qui en fait la protéine la plus grosse de la famille HDAC, et le seul membre à avoir deux sites catalytiques localisés en N-term et dans la région centrale. Ces deux domaines sont complètement fonctionnels et contribuent de façon indépendante à la totalité de l'activité d'HDAC6 (Grozinger et al., 1999; Kawaguchi et al., 2003; Zhang et al., 2006). Enfin, on retrouve en C-term le domaine BUZ de fixation à l'ubiquitine (Seigneurin-Berny et al., 2001) et un domaine de fixation à la dynéine (DMB) entre les deux sites catalytiques (Kawaguchi et al., 2003) (Figure 38).

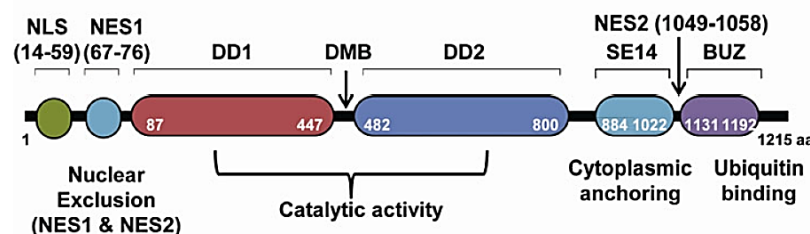


Figure 38 : Représentation schématique d'HDAC6 et de ses domaines fonctionnels. HDAC6 est la seule déacétylase avec deux domaines déacétylase (DD1 et DD2) portant l'activité catalytique. NES empêche l'accumulation de la protéine dans le noyau et la région SE14 permet un ancrage d'HDAC6 dans le cytoplasme. Le domaine NLS permet la translocation d'HDAC6 dans le noyau. Le domaine DMB (dynein motor binding) entre les deux domaines catalytiques permet une forte fixation aux dynéines. Le domaine BUZ (ubiquitin-binding zinc finger domain) permet une forte interaction avec les protéines mono ou poly-ubiquitinées. Illustration d'après (Yingxiu Li et al., 2012).

I.3 HDAC6 : régulation et signalisation

Par sa capacité à désacétyler l' α -tubuline, HDAC6 est impliquée dans diverses fonctions, comme la régulation de la résorption du cil primaire, le trafic du récepteur à l'EGF par la

déacétylation de la β -caténine (Aldana-Masangkay and Sakamoto, 2011; Gao et al., 2010; Pugacheva et al., 2007). Tout d'abord, HDAC6 est phosphorylée par HEF1 et AurA à la base du cil, ce qui engendre une augmentation de son activité de déacétylation de la tubuline. L'inhibition spécifique d'HDAC6 par la tubacine, ou l'utilisation d'un inhibiteur contre la kinase AuroraA stabilise le cil et empêche sa résorption au cours du cycle cellulaire (Pugacheva et al., 2007). D'autres études ont pu montrer qu'HDAC6 régule la translocation nucléaire de la β -caténine, et le trafic du récepteur à l'EGF (Gao et al., 2010; Li et al., 2008b). L'inhibition d'HDAC6 empêche la localisation nucléaire de la β -caténine induite par l'EGF, et diminue l'expression de c-Myc ce qui engendre une diminution de la prolifération des cellules épithéliales. Ces résultats suggèrent qu'HDAC6 est capable de réguler la voie Wnt en désacétylant la β -caténine.

I.4 Tubuline and Cortactine

Le premier substrat d'HDAC6 identifié est la tubuline. L'acétylation réversible de la tubuline est impliquée dans la régulation de la stabilité des microtubules (Hubbert et al., 2002; Piperno et al., 1987; Zhang et al., 2003). La surexpression d'HDAC6 dans les cellules de mammifères conduit à une hypoacétylation de la tubuline et favorise les déplacements cellulaires par chimiotactisme (Cabrero et al., 2006; Hubbert et al., 2002). Au contraire, l'inhibition de l'activité d'HDAC6, de façon pharmacologique ou génétique, engendre une hyperacétylation de la tubuline et des microtubules, augmente l'adhésion cellulaire, et diminue les capacités de déplacements des fibroblastes (Haggarty et al., 2003; Tran et al., 2007; Zhang et al., 2008). En plus de son interaction avec la tubuline, HDAC6 acétyle la protéine remodelant l'actine corticale : la cortactine (Zhang et al., 2007). La surexpression d'HDAC6 engendre une hypoacétylation de la cortactine, alors que son inhibition cause une hypoacétylation de cette protéine, ce qui empêche sa translocation à la périphérie de la cellule bloquant ainsi son association avec l'actine F ce qui conduit à la perte de la motilité cellulaire. Il apparaît alors, qu'HDAC6 joue un rôle important dans le contrôle du déplacement cellulaire, en altérant les niveaux d'acétylation de la tubuline et de la cortactine.

I.5 Protéines reliées au stress

Après la tubuline, le second substrat principal d'HDAC6 est Hsp90 (heat shock protein 90) (Bali et al., 2005; Kovacs et al., 2005). L'activité de cette protéine est fortement contrôlée par son niveau d'acétylation au cours de différents processus cellulaires. Dans les cellules au repos, HDAC6 est associée avec un complexe protéique composé de VCP, p97, la protéine chaperonne Hsp90 et HSF1 (heat-shock factor 1) (Boyault et al., 2007). Cependant, l'accumulation de protéines mal repliées lors d'un état de stress engendre la libération d'HDAC6 de ce complexe, ce qui conduit à l'activation d'HSF1. Une fois activée, HSF1 permet la transcription d'Hsp90 qui pourra exercer son activité de chaperonne sur les protéines à replier.

L'inhibition d'HDAC6 engendre une hyperacétylation d'Hsp90 ce qui affaiblit l'activation du récepteur aux glucocorticoïdes dépendant d'Hsp90 (Kovacs et al., 2005; Murphy et al., 2005). Une étude récente, a montré que les souris HDAC6^{-/-} sont protégées contre l'intolérance au glucose, la résistance à l'insuline et l'hyperglycémie induite par la dexaméthasone engendrés par une réduction de la translocation nucléaire du récepteur aux glucocorticoïdes (Winkler et al., 2012).

II. Rôles des glucocorticoïdes dans la lipogenèse, l'adipogenèse et la lipolyse

Les glucocorticoïdes ont des effets complexes sur le tissu adipeux favorisant à la fois la lipolyse et l'adipogenèse. Une des caractéristiques cliniques de l'excès de glucocorticoïdes dans le syndrome de Cushing engendre une obésité abdominale et une perte du tissu adipeux sous-cutané aux extrémités des membres. L'obésité abdominale est fortement associée à la résistance à l'insuline, aux pathologies cardiovasculaire et à l'hypertension contribuant ainsi significativement aux mauvais pronostiques associés à l'excès de tissu adipeux (Arnaldi et al., 2004; Despres, 1993; Mancini et al., 2004). La complexité de la signalisation des glucocorticoïdes dans le tissu adipeux dépend à la fois des dépôts adipeux en question et de la concentration intracellulaire des glucocorticoïdes.

De récentes études ont pu mettre en avant l'augmentation compétitive de la synthèse des triglycérides et de la lipolyse dans les dépôts adipeux inguinales de souris traitées à la dexaméthasone et dans le tissu adipeux sous cutané des souris modèles pour le syndrome de Cushing (CHR-Tg) (Harris et al., 2013; Yu et al., 2010a). Comparé aux souris traitées avec un placebo, le traitement à la dexaméthasone augmente l'expression de nombreux gènes impliqués dans la synthèse des triglycérides (Scd2, Gpat3, Gpat4, Agpat2 et Lipin1), les gènes de la lipolyse (Lipe et Mgl1), les gènes impliqués dans le transport des lipides (Cd36, Lrp1, Slc27a2 et Vldlr) et dans leur stockage (S3-S12) dans le tissu adipeux inguinal de souris (Yu et al., 2010a). De plus, il a été décrit que les cultures *ex vivo* des adipocytes viscéraux, mais pas ceux du tissu adipeux sous cutané de rats traités aux glucocorticoïdes, montraient un taux de lipolyse plus important comparé aux cultures contrôles, ce qui suggère une augmentation du flux d'acides gras provenant du tissu adipeux viscéral vers le foie (Campbell et al., 2011). Enfin il a été observé chez des rats traités pendant dix jours à la corticostérone, une augmentation du tissu adipeux viscéral causé par une augmentation de la différenciation adipocytaire des progéniteurs adipeux (Campbell et al., 2011). En accords avec ces résultats, les glucocorticoïdes, et plus précisément la dexaméthasone est ajoutée fréquemment dans les cocktails hormonaux utilisés pour induire la différenciation adipocytaire des progéniteurs adipeux en culture (Pantoja et al., 2008).

L'étude que nous avons menée a permis de mettre en avant l'augmentation du niveau d'expression d'HDAC6 au cours de la différenciation. De plus, nous avons observé que les cellules différenciées ayant le niveau d'expression d'HDAC6 le plus élevé correspondent aux cellules dans lesquelles n'est plus présent. L'analyse de la fonction d'HDAC6 montre qu'elle est nécessaire au cours de l'adipogenèse. Les traitements des cellules par la tubacine, un inhibiteur spécifique d'HDAC6, conduit à une inhibition de la différenciation, ainsi qu'une inhibition de l'élongation du cil en réponse à la dexaméthasone. D'un autre côté, la surexpression d'HDAC6 conduit aussi à l'inhibition de l'adipogenèse, indépendamment de la voie des glucocorticoïdes. Ces résultats semblent indiquer que la déacétylase de la tubuline est impliquée dans le contrôle de la différenciation adipocytaire. De plus, bien qu'HDAC6 augmente au cours de la

différenciation adipocytaire, l'augmentation de son expression ne semble pas suffisante pour expliquer la perte du cil dans les cellules différenciées.

PUBLICATION 1



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

The primary cilium undergoes dynamic size modifications during adipocyte differentiation of human adipose stem cells

Nicolas Forcioli-Conti ^{a, b, c}, Sandra Lacas-Gervais ^d, Christian Dani ^{a, b, c},
Pascal Peraldi ^{a, b, c, *}

^a University of Nice Sophia Antipolis, UFR Sciences, Nice F-06108, France

^b CNRS, UMR7277, F-06108, France

^c Inserm, U1091, Nice F-06108, France

^d Centre Commun de Microscopie Appliquée, University of Nice Sophia Antipolis, UFR Sciences, 13 Parc Valrose, F-06108 Nice, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 January 2015

Available online xxx

Keywords:

Primary cilium

Adipocyte differentiation

Human adipose stem cells

ABSTRACT

The primary cilium is an organelle present in most of the cells of the organism. Ciliopathies are genetic disorders of the primary cilium and can be associated with obesity. We have studied the primary cilium during adipocyte differentiation of human adipose stem cells (hASC). We show here that the size of the primary cilium follows several modifications during adipocyte differentiation. It is absent in growing cells and appears in confluent cells. Interestingly, during the first days of differentiation, the cilium undergoes a dramatic elongation that can be mimicked by dexamethasone alone. Thereafter, its size decreases. It can still be detected in cells that begin to accumulate lipids but is absent in cells that are filled with lipids. The cilium elongation does not seem to affect the localization of proteins associated with the cilium such as Kif3-A or Smoothened. However, Hedgehog signaling, an anti-adipogenic pathway dependent on the primary cilium, is inhibited after three days of differentiation, concomitantly with the cilium size increase. Together, these results shed new light on the primary cilium and could provide us with new information on adipocyte differentiation under normal and pathological conditions.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The primary cilium is an organelle present in one copy in most of the cells of the organism [1–3]. It is composed of a basal body and an axoneme made of 9 doublets of tubulin. The cilium has different functions. It is used as a mechanoreceptor in kidney cells, and bears the photoreceptors in rods and cones. This organelle has also important signaling transduction properties. Signaling pathways, such as Hedgehog, Wnt and TGF, are, to some extent, dependent upon the primary cilium. The cilium itself is regulated. It disappears during cell proliferation. Indeed, during mitosis, centrioles of the basal body are recruited to form the centrosome which nucleates the mitotic spindle. When cells enter the G0 phase

of the cell cycle the centrioles migrate to the plasma membrane, in vicinity to the nucleus, to re-form the basal body and the axoneme of the cilium. The primary cilium also disappears during specific biological processes, such as the differentiation of mesenchymal stem cells. Indeed, we have shown that osteoblastic differentiation of human adipose stem cells (hASC) is associated with a loss of the cilium [4]. Marion et al. have shown that the cilium disappears during adipocyte differentiation [5]. More recently, Fu et al. showed that the cilium disappears during myogenic differentiation [6].

The importance of the cilium in adipogenesis is supported by the phenotype of patients suffering from Bardet–Biedl and Alström syndromes [7,8]. Indeed, these ciliopathies are associated with obesity. It is thus important to understand the biological regulations of the primary cilium during adipocyte differentiation.

Although it has previously been shown that adipocytes do not possess a primary cilium [5] the precise details of the behavior of the primary cilium during adipocyte differentiation was still unknown. Here, we reveal that hASC possess a primary cilium, the size of which undergoes several modifications during the adipocyte differentiation process. We show that the cilium undergoes a

Abbreviations: hASC, human adipose stem cells; Hh, Hedgehog; IBMX, isobutyl methyl xanthine.

* Corresponding author. iBV, Institut de Biologie Valrose, Université Nice Sophia Antipolis, Tour Pasteur, UFR Médecine, 28, avenue de Valombrose, 06189 Nice Cedex 2, France.

E-mail address: peraldi@unice.fr (P. Peraldi).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.078>

0006-291X/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

dramatic increase in size during the first days of differentiation. Interestingly, the cilium can still be detected in cells that begin to accumulate lipids. It disappears when cells are filled with lipids. This modulation of cilium size could have important functions in adipogenesis under normal and pathological conditions.

2. Material and methods

2.1. Material

Shh-conditioned medium was obtained from an HEK 293 cell line stably transfected with Shh-N expression vector (ATCC #CRL-2782). Antibodies: monoclonal anti-acetylated tubulin was from Sigma–Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), guinea pig anti-perilipin 1 was from Acris antibodies (Herford, Germany), rabbit anti-Kif-3A was from Abcam (Cambridge, UK), rabbit anti-Smoothed was from Santa Cruz Biotechnologies (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). Anti-mouse antibody coupled to Alexa fluor 488, anti-rabbit antibody coupled to Alexa fluor 647 and anti-guinea pig antibody coupled to Alexa fluor 594 were from Life Technologies (Saint Aubin, France).

2.2. Growth and adipocyte differentiation of hASC

Establishment and characterization of the adipocyte differentiation of hASC have been previously described [9]. These cells are multipotent, display a normal karyotype and are not transformed. hASC were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2.5 ng/ml hFGF-2, 60 µg/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin. At day 2 post-confluence (designated day 0), cells were induced to differentiate into adipocytes in the presence of DMEM/Ham's F12 media supplemented with 0.85 µM insulin, 10 µg/ml transferrin, 1 µM dexamethasone, 100 µM isobutyl-methyl xanthine (IBMX), and 0.1 µM rosiglitazone. Three days later, the medium was changed (dexamethasone and IBMX were omitted). Media were changed twice a week.

2.3. Immunocytochemistry

Cells were seeded on cover slips and treated as described in the text. Cells were rinsed twice with PBS and fixed with Roti-Histofix (Roth, Lauterbourg, France) for 20 min at room temperature or with methanol at -20°C . Fixed-cells were incubated in PBS with 3% bovine serum albumin (BSA), 0.1% tween-20 and 0.1% triton X-100 for 30 min at room temperature. Cells were then incubated with the appropriate antibodies in the same buffer for 90 min at room temperature. After 3 washes in PBS, cover slips were incubated with the appropriate secondary antibody coupled to Alexa Fluor (1:600) for 45 min at room temperature. At least ten representative fields were examined for each condition. The total number of cilia was counted along with total number of nuclei for at least 50 cells. Cilia length was measured using Fiji [10].

2.4. RNA extraction and analysis

Total RNAs were extracted with the TRI-Reagent kit (Euro-medex, Souffelweyersheim, France) according to manufacturer's instructions. Total RNA was subjected to real-time quantitative reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) analysis as described in Ref. [11] except that Sybr Green was from Takara (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). Primers were designed using Primer Express software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and validated by testing PCR efficiency using standard curves ($85\% \leq \text{efficiency} \leq 115\%$). Gene expression was quantified

using the comparative C_T (threshold cycle) method on a StepOne-Plus system (Applied Biosystems); TBP was used as reference.

Primers used (Forward; Reverse):

TBP: CACGAACCACGGCACTGATT, TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC;
Gli1: TGCACTAAAGCCTTCAGCAATG, TTTTCGACGAGCTAGGAT;
PPAR γ : AGCCTCATGAAGAGCCTTCCA; AGCCTCATGAAGAGCCTTCCA;
PLN: ACCATCTCCACCCGCTC; GATGGGAACGCTGATGCTGT;
BBS10: TGAAAACATTCAAACCATGGA; CGTTAGGAGAGCCTGGAAAA;
BBS12: GCTCAGGGTGCTGCATAAT, TTGGTCTGTATATTGCCAGAGATGA;
Kif3A: TACTGGACAGCGCTAAAGGA; CCAAGGCAGAAATTACATTACCA;
IFT88, TGACATCTGCAAACTCATTGCT; TCCACGCACCAATCATAACCT;
SREBP: GGAGGGGTAGGGCCAACGGCT; CATGTCTTCGAAAGTGCAATCC.

2.5. Electron microscopy

After hours of fixation, the samples were rinsed in distilled water, dissected and dehydrated with a series of ethanol solutions of increasing concentrations. Samples were then dried using hexamethyldisilane (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and sputter-coated with 3-nm gold–palladium coating prior analysis with the scanning electron microscope, JEOL 6700F. The pictures were collected at low voltage 1–3 kV.

2.6. Statistics

Data are shown as means \pm SD. Statistically differences between groups were analyzed using unpaired Student's *t* test.

3. Results

3.1. The primary cilium undergoes a transient elongation during adipocyte differentiation

We studied the primary cilium throughout adipocyte differentiation. To do this, hASC were grown and adipocyte differentiation was induced as described in Materials and Methods. Cells were fixed at proliferation (Supplementary Fig. 1), at day 0 (two days after cell confluence) and 3, 7, and 14 days after the induction of differentiation. Acetylated alpha tubulin, which is concentrated in the axoneme and widely recognized as a specific marker of the primary cilium, was detected by immunocytochemistry. Adipocyte differentiation was assessed through perilipin expression, a protein that surrounds lipids droplets in adipocytes (Fig. 1A). The size of the cilium (Fig. 1B), and the percentage of cells displaying a primary cilium (Fig. 1D) were quantified. As expected, proliferating cells do not exhibit a primary cilium (Supplementary Fig. 1 and Fig. 1D). At day 0, most of the cells (76%) exhibit a primary cilium. At this point, the size of the cilium is relatively homogenous, with more than 80% of the cilia ranging between 2 and 4 µm. Interestingly, after 3 days, the size of the cilium increases and is more heterogeneous. Most of the cells display a cilium between 4 and 8 µm and more than 20% of the cilia are longer than 8 µm. This increase in size is still apparent at day seven, when some cells begin to accumulate lipids. It can be noted that several perilipin-positive cells maintain a cilium. At day 14, only 20% of the cells display a primary cilium with a size similar to the one observed at day 0. At this point, cells exhibiting a primary cilium do not accumulate lipids; and conversely, all perilipin-positive cells are missing a cilium.

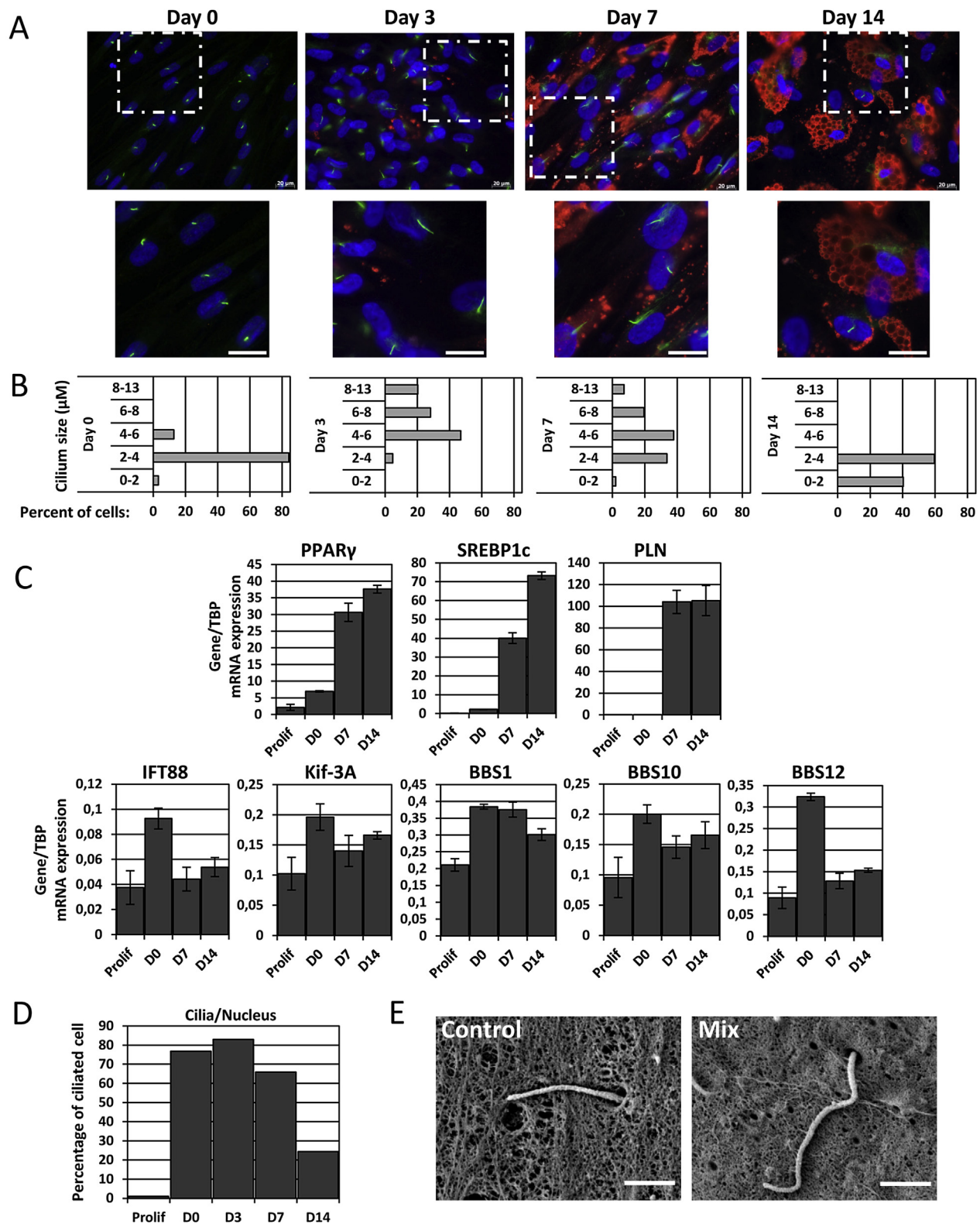


Fig. 1. A) hASC were treated for various days with a differentiation mix (MIX). At the indicated time cells were fixed. Acetylated tubulin (in green) and perilipin (in red) were revealed by immunocytochemistry. Nuclei were stained with Hoechst 33258. The white bar represents 20 μm . The insets represent a magnification of the dotted box. B) Cilia were measured. Percentages of cilia belonging in each class size were represented in the histograms. C) RNA were extracted at the indicated time and gene expression was measured using quantitative RT-PCR. D) The percentage of cells displaying a primary cilium from 1A was measured and is represented in this histogram. E) hASC were treated for three days with a control medium or with the differentiation mix (MIX). Cells were fixed and analyzed by scanning electron microscopy. The white bar represents 1 μm . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

We then analyzed the cilium size through electron microscopy. hASC were treated for three days with a control or a differentiation medium, fixed and visualized by scanning electron microscopy (Fig. 1E). As observed, hASC exhibit a primary cilium, with a visible ciliary pocket. The size of the cilium was more important in cells treated for three days with the differentiation medium. This confirms the results obtained with immunocytochemistry and ruled out the possibility that the increase in cilium size was linked to a modification in the composition of acetylated tubulin of the axoneme. It also indicates that the increase in cilium length takes place outside of the cell, and is not linked to an increase of this organelle in the intracellular compartment.

We then compared the time-course between the modulation of cilium size and the expression of specific genes. We tested the expression of adipocyte-specific genes (PPAR γ , SREBP1c, Perilipin), and of several cilium-related gene (IFT88, Kif-3A, BBS1, BBS10, BBS12) using quantitative RT-PCR (Fig. 1C). As observed, the kinetic of the increase in cilium size and its disappearance at day 14 does not seem to be paralleled by the expression of the tested genes. Moreover, the loss of the cilium appears later than the expression of the adipocyte specific genes that we tested. The loss of the cilium is a late event in adipocyte differentiation and corroborates the observation that cells that begin to accumulate lipids still maintain a cilium.

These data indicate that the primary cilium is dynamically regulated during the differentiation process. It grows in size during the first days of differentiation. Thereafter, it can be still detected in cells that begin to accumulate triglyceride but is absent in lipid-loaded cells.

3.2. Dexamethasone increases cilia length

We then tried to isolate the component of the differentiation medium responsible for the increase in cilia length. hASC were

treated with the control medium, or with the control medium supplemented with transferrin, insulin, rosiglitazone, IBMX, dexamethasone, or with the complete differentiation medium. After three days, the cilium was analyzed as described for Fig. 1. As observed in Fig. 2A, only dexamethasone causes an increase of the cilium length. We then performed a dose–response study of dexamethasone. Cells were treated with increasing doses (from 10 nM to 1 μ M) of dexamethasone for 3 days. The cilium was then measured (Fig. 2B). The effect of dexamethasone is apparent at 10 nM, with a maximal effect observed at 1 μ M (see Supplemental Fig. 2 for photographs).

3.3. The increase in cilium length does not modify the localization of cilium proteins but is concomitant with a loss of Hh signaling

We then tested if the increase in the cilium size was associated with a modification in the localization of ciliary proteins. We studied two well described proteins located in the cilium: the kinesin Kif-3A, and smoothened, a transmembrane protein that controls the Hh pathway. hASC were treated for 3 days with or without the differentiation medium and the localization of Kif-3A and Smoothened was analyzed by immunocytochemistry. As observed in Fig. 3A, Kif-3A is localized at the tip and the base of the cilium while smoothened is detected at the base of the primary cilium. The differentiation medium increases the size of the cilium but did not modify the localization of these proteins. Same results were obtained with dexamethasone alone (data not shown). We then looked at Hh signaling. Indeed, Hh is probably the most well defined signaling pathway the activation of which is dependent upon the primary cilium. Cells were treated or not for three days with the differentiation medium then treated for 24 h with Shh. The expression of Gli-1, a reliable marker of Hh activity [12–14],

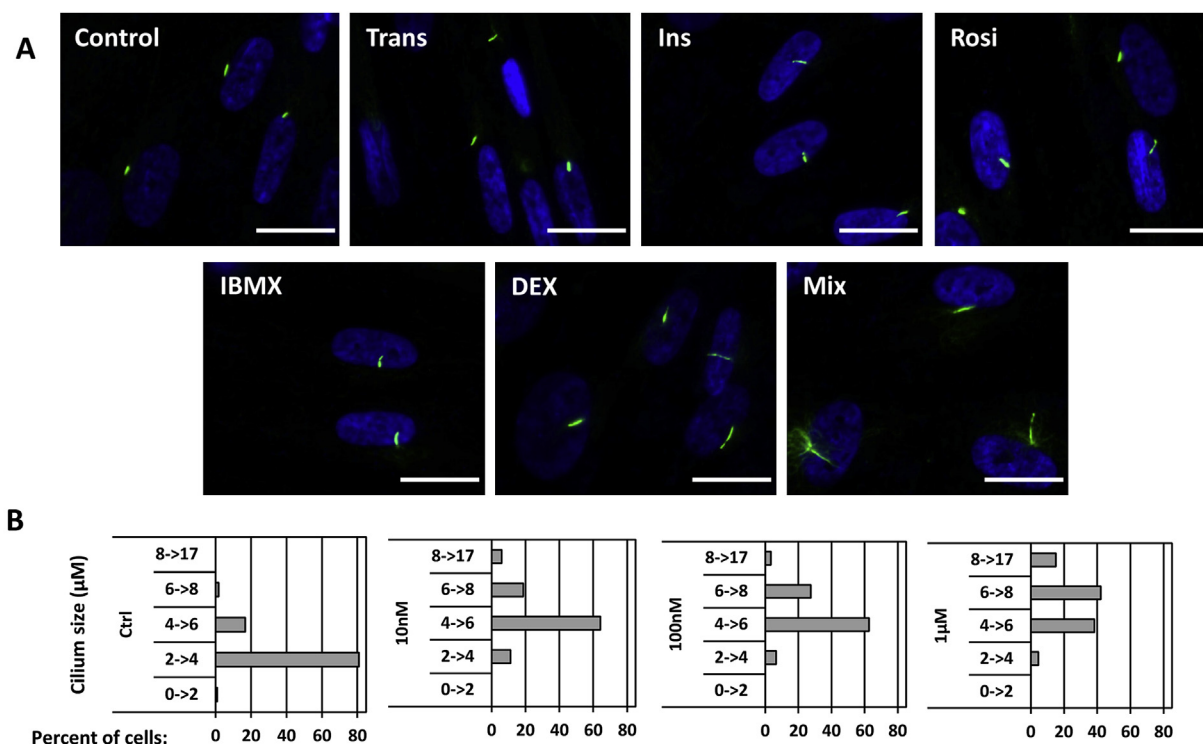


Fig. 2. A) hASC were treated with the control medium (Control), or with the control medium supplemented with transferrin (Trans), insulin (Ins), rosiglitazone (Rosi), IBMX, Dexamethasone (Dex), or with the complete differentiation mix (MIX) for three days. Acetylated tubulin (in green) was revealed by immunocytochemistry. Nuclei were stained with Hoechst 33258. The white bar represents 20 μ m. B) hASC were treated with a control medium (Ctrl), with 10, 100 nM and 1 μ M of dexamethasone (Dex) for three days. Cilia were measured. The percentages of cilia belonging in each class size are represented in the histograms. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

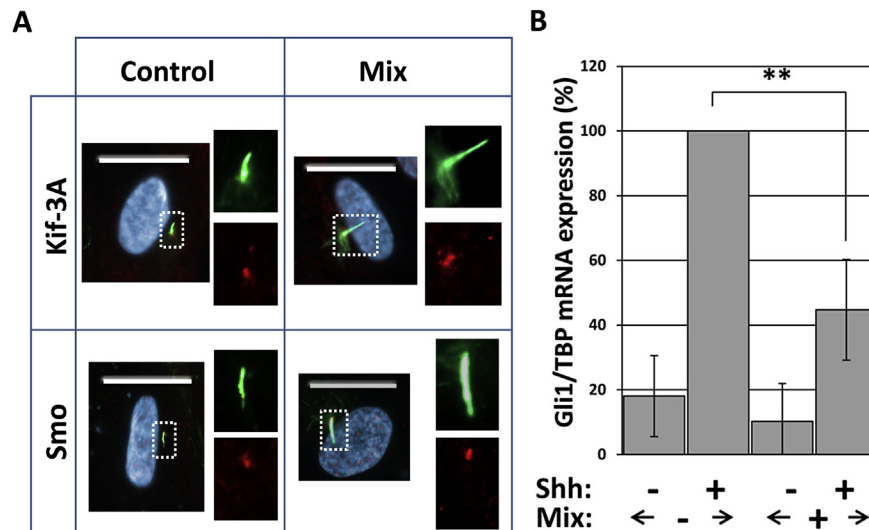


Fig. 3. A) hASC were treated with the control medium (Control) or a differentiation mix (MIX) for three days. Acetylated tubulin (in green) and Kif-3A or Smoothed (smo) (in red) were revealed by immunocytochemistry. Nuclei were stained with Hoechst 33258. The white bar represents 20 μ m. The insets represent a magnification of the red and green channels in the dotted box. Please note that these insets are not at the same scale between each condition. B) hASC were treated with “-” or without “+” differentiation mix (MIX) for three days. Gli-1 expression was evaluated by real-time quantitative (RT-PCR). Control medium + aShh was taken as 100%. Results are the mean \pm SD of three experiments performed in triplicate. ** $p < 0.01$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

was then measured by quantitative RT-PCR. As observed in Fig. 3B, Shh treatment induces a 5-fold increase in Gli-1 expression in control cells. A 50% decrease in Gli-1 expression is observed in cells treated for 3 days with the differentiation medium. Thus, cells treated with the differentiation medium are resistant to Hedgehog.

4. Discussion

The primary cilium was first described in 1898 [15] but it began to draw particular attention when its involvement in Hedgehog signaling became apparent in 2005 [16]. Since then, its implication in various biological functions has been revealed [1–3]. The involvement of the primary cilium in adipogenesis is supported by the observation that patients suffering from ciliopathies such as Bardet–Biedl and Alström syndromes are obese [7,8]. Although these patients suffer hyperphagia, pair-feeding experiments of *bbs2*^{-/-} and *bbs4*^{-/-} mice have revealed that hyperphagia is not sufficient to explain obesity [17] and, consequently, that adipogenesis is affected in these ciliopathies.

We show here that the cilium undergoes several modifications during adipocyte differentiation: it is present in confluent cells; it grows in size during the first days of differentiation and then disappears when cells are loaded with lipids.

4.1. What induces the increase in cilium size after three days of differentiation?

Cell shape and the actin cytoskeleton, in particular actin stress fibers, have been shown to affect the frequency and the size of the primary cilium. Cell displaying stress fibers are less likely to grow a cilium than confined cells [18]. A functional screen for modulators of cilium length has allowed for the identification of actin-regulating proteins as well as proteins involved in vesicle trafficking. In this study, the authors proposed that actin dynamics, rather than global actin cytoskeleton rearrangement, control cilio-genesis [19]. Adipocyte differentiation is associated with a reorganization of the actin cytoskeleton from stress fibers to cortical fibers [20]. This phenomenon could be responsible, by part, for the increase in size of the primary cilium during the first days of

differentiation. However, since the cytoskeletal reorganization is maximal after 12 days of differentiation it is not sufficient to explain the modifications sustained by the cilium during adipogenesis. The size-increase of the primary cilium during adipocyte differentiation could be mimicked by dexamethasone alone. Interestingly, although hASC could differentiate to some extent in absence of insulin or IBMX, they failed to differentiate in absence of dexamethasone and rosiglitazone [21]. In hASC, increasing cAMP by IBMX, was not able to modify significantly cilium length after three days, as has been described in other cell types [22–24].

4.2. What is responsible for the loss of the cilium during adipogenesis?

The loss of the cilium has been studied during cell proliferation. During mitosis, an activation of Aurora A is responsible for the activation of HDAC-6 [25]. HDAC-6 deacetylates tubulin leading to a loss of the primary cilium. Since Aurora A is not activated during adipogenesis (data not shown) the loss of the cilium during adipogenesis must follow another pathway. Comparison between kinetics of gene expression and the ratio of cilium-positive cells indicate that the loss of the cilium is a very late event of adipocyte differentiation. The cilium is composed of at least a thousand of proteins [26,27]. We have tested for the expression of some of them (Fig. 1). We observed that the modulation of their expression is unlikely to explain for the loss of the primary cilium. It is interesting to observe that the loss of the primary cilium is observed only in cells filled with large triglycerides droplets. Cells beginning to accumulate lipids still exhibit a primary cilium. Along these lines, it has been observed that several cancer cells lose their primary cilium in a mechanism that is lipid- and SREBP-1c- dependent [28]. SREBP-1c is a transcription factor induced during adipogenesis that controls, among other things, the expression of enzymes related to lipogenesis. Our experiments of lipids treatment of hASC have not allowed us to observe a modification of the primary cilium (data not shown). It can still be envisioned that, in hASC, only an important amount of lipids; or specific lipids, are responsible for the loss of the cilium.

4.3. What could be the biological function of the modulation of cilium size?

The function of the cilium during adipocyte differentiation is unclear. Marion et al. showed that depletion of BBS12 decreases the ratio of cilium-positive cells and increases adipocyte differentiation [5]. On the other hand, affecting the primary cilium through a decrease in Alms [29], IFT88 or Kif-3A [30,31] expression inhibit adipocyte differentiation. These observations suggest that the primary cilium controls several steps of adipogenesis and cannot be considered only as a “switch” that triggers or inhibits adipocyte differentiation. This appears consistent with the various modifications in cilium size that we observe during adipogenesis. After three days of treatment, when the cilium reaches its longer size, cells become resistant to Hh activation. The observation that the differentiation medium does not modifies the cellular localization of smoothened indicates that the mechanism of Hh resistance resides elsewhere. So far, we cannot ascertain that cilium elongation and Hh resistance in 3 days-differentiated cells are causally linked. However, we observed previously that Hh signaling inhibits the maturation of hASC [11]. By affecting Hh signaling, cells would protect themselves from an anti-adipogenic effect of Hh. It can also be envisioned that the increase in cilium size could allow for the amplification of specific signaling pathways that remains to be identified. Alternatively, the increase in the cilium size could help to “fish” for pro-adipogenic-circulating molecules. Indeed, because the cilium “floats” freely in the extracellular medium, receptors located at its surface would be more likely in contact with putative ligands in a longer cilium than in a shorter one.

Our results show that the primary cilium undergoes several size modifications during adipocyte differentiation of hASC. This suggests that the cilium could have various functions during adipogenesis. If indeed the increase in size of the cilium, and its loss at the latter stage of differentiation, play a role in adipocyte differentiation it could be interesting to determine if the cilium from adipose stem cells of obese patients or patients suffering from ciliopathies undergoes the same variation than the cilium from adipose stem cells of healthy patients.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Société Française du Diabète (SFD), by the French Government INSERM, CNRS and ANR through the « Investments for the Future » LABEX SIGNALIFE: program reference # ANR-11-LABX-0028-01. We are grateful to Drs. A. Ladoux and S. Giorgetti-Peraldi for helpful comments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.078>.

References

- [1] H. Ishikawa, W.F. Marshall, Ciliogenesis: building the cell's antenna, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (2011) 222–234.
- [2] J.R. Davenport, B.K. Yoder, An incredible decade for the primary cilium: a look at a once-forgotten organelle, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 289 (2005) F1159–F1169.
- [3] N.F. Berbari, A.K. O'Connor, C.J. Haycraft, B.K. Yoder, The primary cilium as a complex signaling center, *Curr. Biol.* 19 (2009) R526–R535.
- [4] M. Plaisant, C. Fontaine, W. Cousin, N. Rochet, C. Dani, P. Peraldi, Activation of hedgehog signaling inhibits osteoblast differentiation of human mesenchymal stem cells, *Stem Cells* 27 (2009) 703–713.
- [5] V. Marion, C. Stoetzel, D. Schlicht, N. Messaddeq, M. Koch, E. Flori, J.M. Danse, J.L. Mandel, H. Dollfus, Transient ciliogenesis involving Bardet–Biedl syndrome proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106 (2009) 1820–1825.
- [6] W. Fu, P. Asp, B. Canter, B.D. Dynlacht, Primary cilia control hedgehog signaling during muscle differentiation and are deregulated in rhabdomyosarcoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 111 (2014) 9151–9156.
- [7] G. Novarino, N. Akizu, J.G. Gleeson, Modeling human disease in humans: the ciliopathies, *Cell* 147 (2011) 70–79.
- [8] D. Girard, N. Petrovsky, Alstrom syndrome: insights into the pathogenesis of metabolic disorders, *Nat. Rev. Endocrinol.* 7 (2011) 77–88.
- [9] A.M. Rodriguez, C. Elabd, F. Delteil, J. Astier, C. Vernochet, P. Saint-Marc, J. Guesnet, A. Guezennec, E.Z. Amri, C. Dani, G. Ailhaud, Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (2004) 255–263.
- [10] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods* 9 (2012) 676–682.
- [11] C. Fontaine, W. Cousin, M. Plaisant, C. Dani, P. Peraldi, Hedgehog signaling alters adipocyte maturation of human mesenchymal stem cells, *Stem Cells* 26 (2008) 1037–1046.
- [12] J.E. Hooper, M.P. Scott, Communicating with Hedgehogs, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 306–317.
- [13] A. Ruiz i Altaba, C. Mas, B. Stecca, The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer, *Trends Cell Biol.* 17 (2007) 438–447.
- [14] N.A. Riobo, D.R. Manning, Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs, *Biochem. J.* 403 (2007) 369–379.
- [15] K. Zimmerman, Beiträge zur Kenntniss einiger Driisen und Epithelien, *Arch. Mikrosk. Anat. EntwMech.* 52 (1898) 552–706.
- [16] K.C. Corbit, P. Aanstad, V. Singla, A.R. Norman, D.Y. Stainier, J.F. Reiter, Vertebrate smoothened functions at the primary cilium, *Nature* 437 (2005) 1018–1021.
- [17] K. Rahmouni, M.A. Fath, S. Seo, D.R. Thedens, C.J. Berry, R. Weiss, D.Y. Nishimura, V.C. Sheffield, Leptin resistance contributes to obesity and hypertension in mouse models of Bardet–Biedl syndrome, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 1458–1467.
- [18] A. Pitaval, Q. Tseng, M. Bornens, M. Thery, Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells, *J. Cell Biol.* 191 (2010) 303–312.
- [19] J. Kim, J.E. Lee, S. Heynen-Genel, E. Suyama, K. Ono, K. Lee, T. Ideker, P. Aza-Blanc, J.G. Gleeson, Functional genomic screen for modulators of ciliogenesis and cilium length, *Nature* 464 (2010) 1048–1051.
- [20] M. Kanzaki, J.E. Pessin, Insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes is dependent upon cortical actin remodeling, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 42436–42444.
- [21] M.C. Monteiro, M. Sanyal, M.L. Cleary, C. Sengenès, A. Bouloumie, C. Dani, N. Billon, PBX1: a novel stage-specific regulator of adipocyte development, *Stem Cells* 29 (2011) 1837–1848.
- [22] T.Y. Besschetnova, E. Kolpakova-Hart, Y. Guan, J. Zhou, B.R. Olsen, J.V. Shah, Identification of signaling pathways regulating primary cilium length and flow-mediated adaptation, *Curr. Biol.* 20 (2010) 182–187.
- [23] S. Abdul-Majeed, B.C. Moloney, S.M. Nauli, Mechanisms regulating cilia growth and cilia function in endothelial cells, *Cell. Mol. Life Sci.* 69 (2012) 165–173.
- [24] A.K. Wann, M.M. Knight, Primary cilia elongation in response to interleukin-1 mediates the inflammatory response, *Cell. Mol. Life Sci.* 69 (2012) 2967–2977.
- [25] E.N. Pugacheva, S.A. Jablonski, T.R. Hartman, E.P. Henske, E.A. Golemis, HGF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium, *Cell* 129 (2007) 1351–1363.
- [26] A. Gherman, E.E. Davis, N. Katsanis, The ciliary proteome database: an integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia, *Nat. Genet.* 38 (2006) 961–962.
- [27] P.N. Inglis, K.A. Boroevich, M.R. Leroux, Piecing together a ciliome, *Trends Genet.* 22 (2006) 491–500.
- [28] N. Willemarck, E. Rysman, K. Brusselmans, G. Van Imschoot, F. Vanderhoydonc, K. Moerloose, E. Lerut, G. Verhoeven, F. van Roy, K. Vlemminkx, J.V. Swinnen, Aberrant activation of fatty acid synthesis suppresses primary cilium formation and distorts tissue development, *Cancer Res.* 70 (2010) 9453–9462.
- [29] I. Huang-Doran, R.K. Semple, Knockdown of the alstrom syndrome-associated gene Alms1 in 3T3-L1 preadipocytes impairs adipogenesis but has no effect on cell-autonomous insulin action, *Int. J. Obes. (Lond.)* 34 (2010) 1554–1558.
- [30] N. Qiu, L. Cao, V. David, L.D. Quarles, Z. Xiao, Kif3a deficiency reverses the skeletal abnormalities in Pkd1 deficient mice by restoring the balance between osteogenesis and adipogenesis, *PLoS One* 5 (2010) e15240.
- [31] D. Zhu, S. Shi, H. Wang, K. Liao, Growth arrest induces primary-cilium formation and sensitizes IGF-1-receptor signaling during differentiation induction of 3T3-L1 preadipocytes, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 2760–2768.

PUBLICATION 2



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Research paper

The size of the primary cilium and acetylated tubulin are modulated during adipocyte differentiation: Analysis of HDAC6 functions in these processes

Nicolas Forcioli-Conti^{a, b, c}, David Estève^{d, e}, Anne Bouloumié^{d, e}, Christian Dani^{a, b, c},
Pascal Peraldi^{a, b, c, *}

^a University of Nice Sophia Antipolis, UFR Sciences, Nice, F-06108, France

^b CNRS, UMR7277, F-06108, France

^c Inserm, U1091, Nice, F-06108, France

^d Inserm, UMR1048, Team 1, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse Cedex 4, France

^e Paul Sabatier University, Toulouse Cedex 9, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 April 2015

Accepted 7 September 2015

Available online xxx

Keywords:

Adipocyte

Primary cilium

Acetylated α -tubulin

HDAC6

ABSTRACT

The primary cilium is an organelle present in most of the cells of the organism. Ciliopathies, such as the Bardet Biedl and the Alstrom syndromes are associated with obesity. We, and others, have shown that the primary cilium undergoes size modifications during adipocyte differentiation of human adipose stromal cells. We show here that the levels of acetylated α -tubulin, a constituent of the primary cilium, and the expression of HDAC6, the enzyme that deacetylates α -tubulin and is responsible for the loss of the cilium during mitosis, are modulated during adipogenesis. Moreover, during adipocyte differentiation cells that express higher level of HDAC6 are the first to lose their primary cilium. We have investigated the function of HDAC6 on adipocyte differentiation and on the primary cilium. We observe that inhibition of HDAC6 activity leads to a decrease in adipocyte differentiation. This is associated with an inhibition of the initial elongation of the cilium. Interestingly, overexpression of HDAC6 inhibits adipocyte differentiation and blunts the elongation of the primary cilium. In both situations, inhibition of adipocyte differentiation was not associated with an inhibition of the glucocorticoid receptor activity. This indicates that HDAC6 controls adipogenesis through the levels of acetylated α -tubulin. Moreover, we show that although HDAC6 expression increases during adipocyte differentiation it is not sufficient to provoke the loss of the cilium. This suggests the existence of a novel mechanism for the loss of the cilium. Together, these data indicate that HDAC6, and acetylated α -tubulin, are important regulator of adipocyte differentiation.

© 2015 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

Obesity is the result of an imbalance between food intake and energy expenditure. The excess of energy is stored as triglycerides in adipocytes. During obesity both the size and the number of adipocytes are increased. Recent data have underscored the major role of hyperplasia in obesity. Indeed, during obesity (i) variations in omental weight are primarily determined by adipocyte numbers

[1] and (ii) high fat feeding induces a rapid increase in adipocyte precursor proliferation in visceral fat depot, which precedes the maximal expansion of adipocytes [2]. This indicates that, in visceral obesity, hyperplasia is concomitant with, and does not follow, hypertrophy. Thus, the understanding of the molecular mechanisms by which precursors (adipose progenitor cells) differentiate into adipocytes is of particular significance in the study of obesity.

The primary cilium has been suggested to control adipogenesis. This came first from the observation that patients suffering from ciliopathies such as Bardet-Biedl (BBS) and Alstrom syndromes are obese [3,4]. More recently, it was found that loss of the ciliary protein CEP19 results in morbid obesity in human and rodents [5].

* Corresponding author. iBV, Institut de Biologie Valrose, Université Nice Sophia Antipolis, Tour Pasteur, UFR Médecine, 28, avenue de Valombrose, 06189 Nice Cedex 2, France.

E-mail address: peraldi@unice.fr (P. Peraldi).

This raised the hypothesis that alteration of the primary cilium could affect adipogenesis. This was confirmed in transgenic animals. These animals suffer, as human patients do, from hyperphagia. However, BBS2^{−/−} and BBS4^{−/−} mice have white fat depots which are 2–3-fold more developed than pair-fed WT animals [6]. This indicates that ciliopathies, and thus alterations of the primary cilium, are associated with an increase in adipogenesis. The precise function of the primary cilium in the differentiation process is unclear. Indeed, alteration of the primary cilium in BBS12 cells increases adipocyte differentiation [7]. By contrast, modification of the cilium through reduction in Alms, IFT88 or Kif3A expression inhibits adipocyte differentiation [8–10].

There is, however, a consensus in the observation that the cilium undergoes several alterations during adipogenesis. Indeed, during adipocyte differentiation, human adipose stromal cells (hASC) lose their primary cilium [7]. More specifically, we, and others, have shown that the cilium undergoes dynamic size modifications [11,12]. The cilium is present in resting hASC, then its size increases several fold during the first days of differentiation, and it disappears, only when cells are filled with lipids. So far, the causes and consequences of this modulation in cilium size are unclear.

The primary cilium is an organelle present in nearly all cells of the organism [13–15]. It is a post mitotic organelle formed by an axoneme composed of 9 doublets of tubulin. Tubulin within the primary cilium undergoes various post traductional modifications such as acetylation, glutamylation and de-tyrosination. Among these modifications, acetylation of lys 40 of the α -tubulin seems to play an important role in the regulation of the primary cilium. Indeed, deacetylation of α -tubulin leads to the disappearance of the cilium. HDAC6 is the deacetylase involved in all the known biological situations of a loss of the primary cilium: mitosis [16], heat shock [17] and cancer [18].

In this manuscript, we show that the levels of HDAC6 and of acetylated α -tubulin are modulated during adipocyte differentiation. Increasing or decreasing HDAC6 activity modulate acetylated α -tubulin levels and result in an inhibition of the primary cilium elongation and of adipocyte differentiation. These data indicate that HDAC6 is an important regulator of adipocyte differentiation, and its activity, and the level of acetylated α -tubulin are finely tuned during adipogenesis.

2. Material and methods

2.1. Material

Antibodies: monoclonal anti-acetylated α -tubulin and anti- α -tubulin were from Sigma–Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), guinea pig anti-perilipin 1 was from Acris antibodies (Herford, Germany), rabbit anti-Kif-3A was from Abcam (Cambridge, UK) and rabbit anti-HDAC6 was from Cell Signaling (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). Anti-mouse antibody coupled to Alexa fluor 488, anti-rabbit antibody coupled to Alexa Fluor 647 and anti-guinea pig antibody coupled to Alexa fluor 594 were from Life Technologies (Saint Aubin, France).

2.2. Growth and adipocyte differentiation of hASC

Establishment and characterization of the adipocyte differentiation of hASC have been previously described [19]. These cells are multipotent, display a normal karyotype and are not transformed. hASC were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2.5 ng/ml hFGF-2, 60 μ g/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin. At day 2 post-confluence (designated day 0), cells were induced to differentiate into adipocytes in the presence of DMEM/Ham's F12 media

supplemented with 0.85 μ M insulin, 10 μ g/ml transferrin, 1 μ M dexamethasone, 100 μ M isobutyl-methylxanthine (IBMX), and 0.1 μ M rosiglitazone. Three days later, the medium was changed (dexamethasone and IBMX were omitted). Media were changed twice a week.

2.3. hASC-HDAC6 cells

pcDNA-HDAC6 was obtained from Addgene (plasmid #13823) [20]; the HDAC6 insert was excised using Not1, blunted and cloned into the BamHI site in the multicloning site of pBabe, previously blunted. Empty pBabe and pBabe-HDAC6 were transfected into Plat-A cells and supernatants were used to infect hASC. Transduced cells were selected with puromycin (1 μ g/ml).

2.4. Cell proliferation assays

Cells were plated onto 12-wells plates (4500 cells per cm²). After the appropriate time, adherent cells were dissociated in 0.25% trypsin/EDTA and counted with a Coulter counter. For each experiment, three wells per condition were counted.

2.5. Clonal assays

Cells were plated at a density of 5 cells/cm² in 100-mm dishes. 18 days after plating cells were fixed with Roti-Histofix (Roth, Lauterbourg, France) and stained with 0.1% crystal violet. Colonies containing at least 40 cells were enumerated under a light microscope. Medium was changed twice a week.

2.6. Immunocytochemistry

Cells were seeded on glass coverslips and treated as described in the text. Cells were rinsed twice with PBS and fixed with Roti-Histofix (Roth, Lauterbourg, France) for 20 min at room temperature. Fixed-cells were incubated in PBS with 3% bovine serum albumin (BSA), 0.1% tween-20 and 0.1% triton X-100 for 30 min at room temperature. Cells were then incubated with the appropriate antibodies in the same buffer for 90 min at room temperature. After 3 washes in PBS, cover slips were incubated with the appropriate secondary antibody coupled to Alexa Fluor (1:600) for 45 min at room temperature. Unspecific signal was evaluated for each antibody using a control condition without antibody and a non-specific antibody. At least ten representative fields were examined for each condition. The total number of cilia was counted along with total number of nuclei for at least 50 cells. Images were taken on a Zeiss Axio Observer microscope with a EC Plan Neofluar 40X (NA 1.3) oil objective using AxioVision 4.8.2 software. Cilium length was measured using Fiji [21], as described in Ref. [22].

2.7. Western blot

Cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (6 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, pH 7.4, 140 mM NaCl, 3 mM KCl) and lysed in RIPA buffer (50 mM Tris pH7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% Na Deoxycholate, 1 mM Orthovanadate, 5 mM NaF, 2.5 mM Na₄P₂O₇ and Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Meylan, France)) for 10 min at 4 °C. Lysates were centrifuged (8000 g) for 10 min. 10 μ g of proteins were resolved on SDS-PAGE under reducing conditions on a 10% polyacrylamide gel. Proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Merck Millipore, Fontenay sous Bois), and Western blot were revealed using a Biorad Chemidoc XRS + imaging system. Signal intensity was quantified using Quantity One 4.6.8 (Biorad).

2.8. RNA extraction and analysis

Total RNAs were extracted with the TRI-Reagent kit (Euro-medex, Souffelweyersheim, France) according to manufacturer's instructions. Total RNA was subjected to real-time quantitative reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) analysis as described in Ref. [23] except that Sybr Green was from Takara (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). Primers were designed using Primer Express software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and validated by testing PCR efficiency using standard curves ($85\% \leq \text{efficiency} \leq 115\%$). Gene expression was quantified using the comparative C_T (threshold cycle) method on a StepOne-Plus system (Applied Biosystems); TBP (TATA box binding protein) was used as reference. The sequence of the primers used is provided in the [supplementary data](#).

2.9. HDAC6 and ATAT1 analysis in adipose tissue progenitor cells

Subcutaneous human adipose tissues (AT) were obtained from healthy adult women undergoing esthetic plastic surgery ($n = 22$, mean BMI 26.9 ± 3.9 kg/m² (20–39), mean age 38.3 ± 7.9 years (24–57)). All donors gave their informed consent. The CD45-/CD34+/CD31-progenitor cells were obtained from adipose tissue after enzymatic digestion and immunoselection/depletion as previously described [24]. Total RNAs were extracted using the RNeasy kit (Qiagen). The RNA concentration was measured with Ribogreen (Invitrogen). RNAs were reverse-transcribed using Superscript[®] II kit (Invitrogen). TaqMan Primers[®] were from Applied Biosystems (HDAC6:Hs-00997418-m1; ATAT1: Hs-00227713-m1). The amplification reaction was done on 15 ng of the cDNA samples in a final volume of 10 μ L in 384-well reaction plates in a VIIA7 detection system and software (Applied Biosystems). Results were normalized to 18S rRNA levels.

2.10. Statistics: data are shown as means \pm SD

Statistical differences between groups were analyzed using Student's *t* test or by ANOVA using GraphPad InStat 3.02 as indicated in the legend figure.

3. Results

3.1. The levels of acetylated α -tubulin are modulated during adipocyte differentiation

We, and other, have previously shown that the primary cilium

undergoes size modification during adipocyte differentiation of human adipose stromal cells (hASC) [11,12] (illustrated in Fig. 3). We studied if these size modifications were associated with variations in the level of acetylated α -tubulin, which has been shown to control the cilium stability [25]. To do this, hASC were differentiated for 3, 7 and 15 days and lysed. Proteins were extracted and analyzed by Western blot using specific antibodies toward HDAC6 (histone deacetylase 6) the enzyme that deacetylate α -tubulin, KIF3a (kinesin family member 3A, a loading control), perilipin 1 (PLIN, a control of adipocyte differentiation), acetylated α -tubulin (Ac- α Tub) and α -tubulin (Fig. 1). As already described [26], HDAC6 expression increases constantly during adipocyte differentiation. Interestingly, acetylated α -tubulin undergoes a transient increase during adipocyte differentiation. It increases sharply (1.88 fold) after 3 days of differentiation, and return to basal levels after 15 days. α -tubulin expression decreased during adipogenesis as previously described [27].

We then analyzed the expression of several genes known to control α -tubulin acetylation. Cells were differentiated as described for Fig. 1, and gene expression was measured by quantitative RT-PCR. We studied the expression of (i) two enzymes that deacetylate α -tubulin; sirtuin 2: Sirt-2 [28], and HDAC6 [25], (ii) the tubulin acetylase ATAT1 (alpha tubulin acetyltransferase 1) [29], and (iii) Dido3 (death inducer-obliator 3) which has been proposed to control acetylated α -tubulin levels and the length of the cilium through HDAC6 [30]. Expression of aP2 (also known as fatty acid binding protein 4) and PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) were monitored to control adipocyte differentiation. As observed in Fig. 2, HDAC6 and Sirt-2 expression increase during the differentiation process, in parallel with aP2 and PPAR γ . The expression of Dido3 and ATAT1 were not modified significantly during adipogenesis.

These results reveal that the levels of acetylated α -tubulin undergo a burst in expression after 3 days of differentiation and that the levels of the deacetylase HDAC6 and Sirt2 increase during adipogenesis.

3.2. Increase in HDAC6 expression during adipocyte differentiation is associated with a loss of the primary cilium

We analyzed HDAC6 expression during adipocyte differentiation at the cellular level. hASC were treated with a differentiation medium for 0, 3, 7 and 14 days. Cells were fixed and analyzed by immunochemistry with an antibody against HDAC6 (red) and acetylated α -tubulin (green) (Fig. 3). Acetylated α -tubulin is concentrated in the axoneme and widely recognized as a marker of

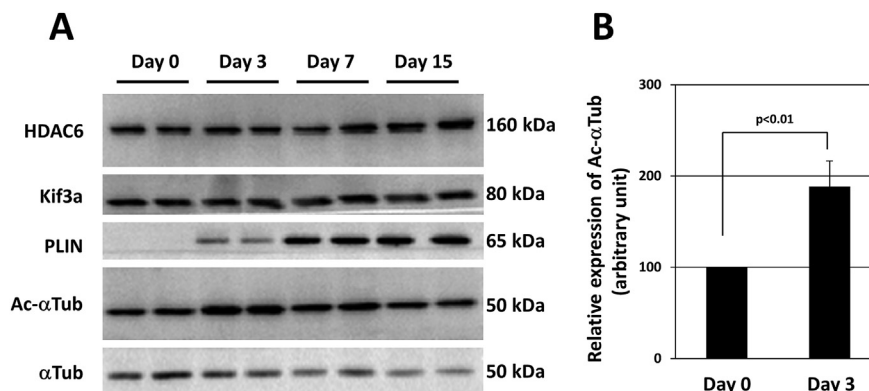


Fig. 1. hASC were differentiated for 15 days. A) Proteins were extracted at the indicated time and analyzed by Western blot. The molecular weight of the proteins are indicated on the right of the Western blot B) Three independent experiments were quantified and the levels of acetylated α -tubulin were compared in hASC and hASC treated for three days with the differentiation medium. Results are presented as mean \pm SD.

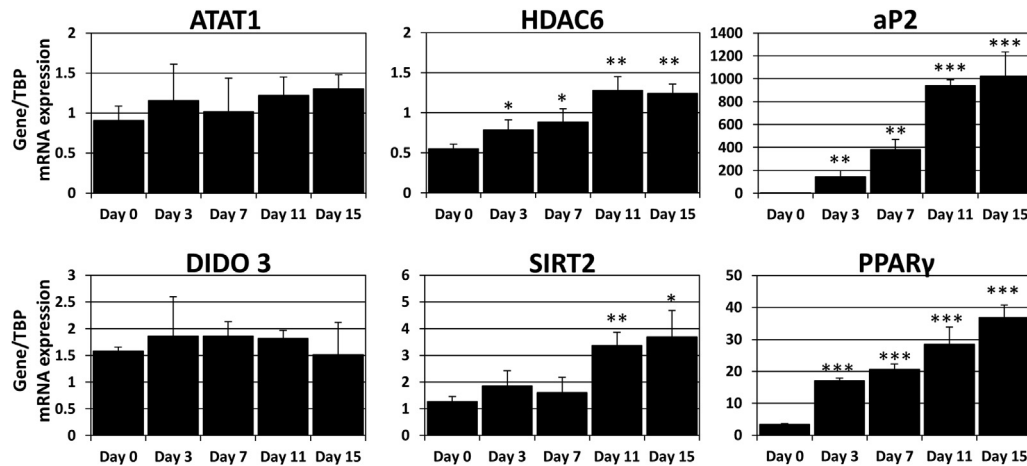


Fig. 2. hASC were differentiated for 15 days. RNAs were extracted at the indicated time and gene expression was measured using quantitative RT-PCR. The figure is representative of three independent experiments performed in triplicate. A t-test was performed to analyze statistically differences between conditions. All conditions were compared to day 0. *:p < 0.5, **:p < 0.01, ***:p < 0.001.

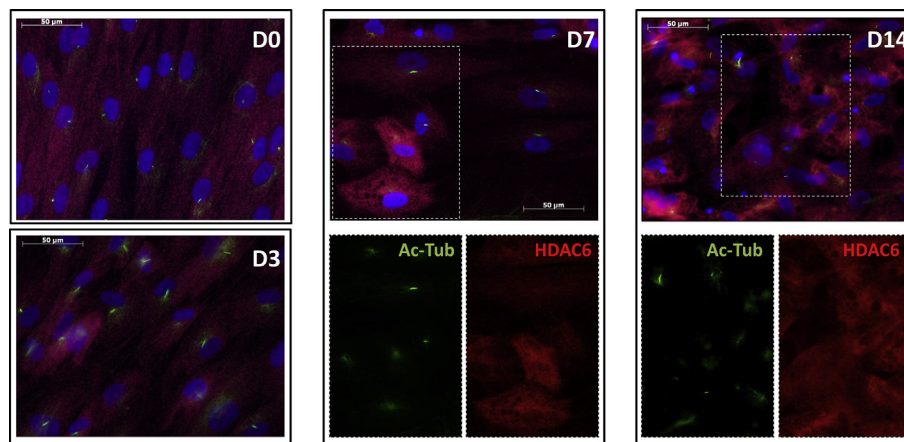


Fig. 3. hASC were differentiated for 0 (D0), 3 (D3), 7 (D7) and 14 (D14) days. Cells were fixed and acetylated α -tubulin (Ac-Tub in green) and HDAC6 (red) were revealed by immunocytochemistry. Nuclei were stained with Hoechst 33258 (blue). The channels corresponding to acetylated α -tubulin and HDAC6 are presented separately, for the part of the merged picture that is enclosed by the dotted line. This data are representative of more than three independent experiments.

the primary cilium [13]. At day 0 (D0) most of the cells express a primary cilium. A punctiform HDAC6 signal is detected in the cytoplasm of the cells. At day 3 (D3) the cilium length increases and some cells begin to accumulate more HDAC6 than others. At this point no obvious association between HDAC6 expression and modification of the primary cilium can be observed. At day 7 (D7), when cells begin to accumulate lipids, some cells express more HDAC6 than others. Interestingly, these cells have lost their primary cilium and only a smear of acetylated tubulin, probably the microtubule organization center, is seen. At day 14 (D14), most of the cells are differentiated, have lost their primary cilium and express similar levels of HDAC6. We have not been able to observe a specific co-localization of HDAC6 in the primary cilium.

This indicates that, during the early stage of adipocyte differentiation, the increase in HDAC6 observed in Western blot is not homogenous among cells. Cells that begin to accumulate earlier HDAC6 are the one that lose their primary cilium first. This suggests that the increase in HDAC6 expression is associated with an increase in its activity that leads to a loss of the cilium.

3.3. Inhibition of HDAC6 activity inhibits adipocyte differentiation

We tested whether modulation of acetylated α -tubulin affects

adipocyte differentiation. To do this we used tubacin, a specific inhibitor of HDAC6 with no activity for other HDAC [31]. First, we verified that tubacin modifies acetylated α -tubulin in hASC. To do this, cells were treated with 1 or 5 μ M of tubacin, and the levels of acetylated α -tubulin were analyzed by Western blot (Fig. 4A). Kif3a was used as a loading control. The effect of tubacin was detectable at 1 μ M and at 5 μ M acetylated α -tubulin was increased by 2.6 fold. We then tested the effect of tubacin on adipocyte differentiation. hASC were differentiated in presence or in absence of 5 μ M tubacin for 14 days. Cells were fixed and analyzed by immunocytochemistry with an antibody against perilipin (red) and acetylated α -tubulin (green) (Fig. 4B). Controlled cells were well-differentiated, as observed by the accumulation of perilipin, and do not display primary cilia. In presence of tubacin most of the cells remained undifferentiated and exhibit a primary cilium. RNAs were extracted and expression of adipocyte markers (PPAR γ , SREBP1c (Sterol regulatory element-binding protein 1c), FAS (fatty acid synthase), Perilipin 1 (PLIN), GLUT4 (Glucose transporter type 4) and aP2) were tested (Fig. 4C). Inhibition of HDAC6 reduces the expression of all adipocyte markers tested. Since hASC can differentiate into adipocytes or osteoblasts [32] we tested if the inhibition of adipocyte differentiation was associated with an increase in the expression of osteoblastic marker. To do this, we monitored the expression of two

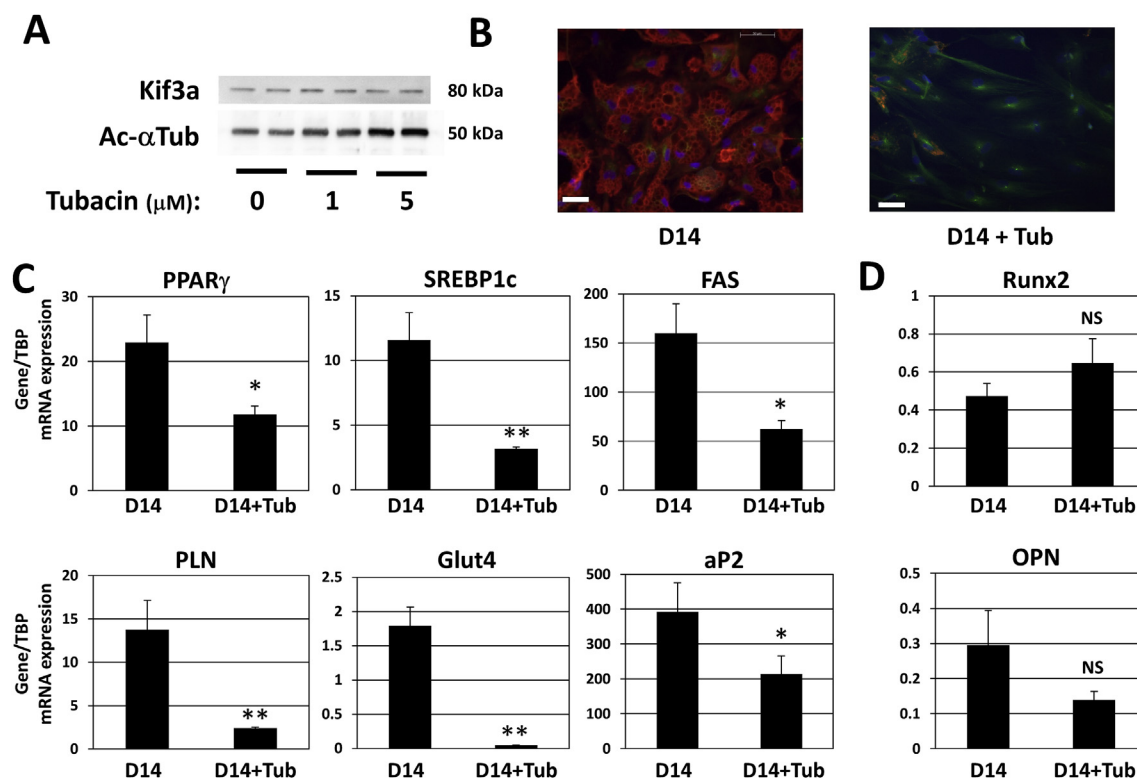


Fig. 4. A) hASC were treated with various concentrations of tubacin. Cells were lysed and analyzed by Western blot using antibodies against acetylated α -tubulin or Kif3a as a loading control. B) hASC were differentiated for 14 days without (D14) or with 5 μ M tubacin (D14 + Tub) for 14 days. Acetylated α -tubulin (in green) and perilipin (in red) were revealed by immunocytochemistry. Nuclei were stained with Hoechst 33258. The white bar represents 50 μ m. C) RNAs were extracted from cells treated as described above and gene expression was measured using quantitative RT-PCR. A t-test was performed to analyze statistically differences between conditions. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ NS: non-significant. This figure is representative of 4 (B and C) and 3 (D) experiments performed in triplicate.

osteoblastic markers: RUNX-2 (runt-related transcription factor 2) and osteopontin (OPN). As illustrated in Fig. 4D tubacin did not modify significantly the expression of the osteoblastic markers tested.

In addition to α -tubulin, HDAC6 deacetylates hsp90, a chaperone that regulates the glucocorticoid receptor [33]. Since dexamethasone is a critical component of the differentiation cocktail of hASC [34] we investigated if the effect of tubacin on differentiation could be the result of an inhibition of the glucocorticoid receptor. To answer this question we evaluated the effect of tubacin on dexamethasone-induced gene in hASC. Confluent hASC were treated with or without dexamethasone in presence or in absence of tubacin for three days. RNAs were extracted and the expression of dexamethasone-target genes were analyzed (Fig. 5). The expression of GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper), COUP-TF (Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) and IL6 (interleukin 6) was regulated by dexamethasone but was not affected by tubacin. By contrast, dexamethasone-regulated gene associated with adipocyte differentiation such as aP2, and PPAR γ were repressed by tubacin. These data indicated that, in hASC, the anti adipogenic effect of tubacin is not mediated by an inhibition of the glucocorticoid receptor.

Since the modulation of the cilium size is biphasic (an increase in length after 3 days followed by a decrease and a loss of the cilium) we performed a time course of tubacin treatment. hASC were differentiated in absence of tubacin (Ctrl) or with tubacin along the differentiation process (D0-14) or only during the first 3 days (D0-3) or between day 3 and day 14 (D3-14). Cells were fixed and stained with Oil red O (Fig. 6A and B) or RNAs were extracted and expression of adipocyte markers were tested (Fig. 6C). As

previously observed a chronic tubacin treatment inhibits adipocyte differentiation. A similar inhibition is observed if tubacin is absent during the first three days of differentiation. Interestingly, when cells were treated only during the first three days the inhibition was less potent. At the microscopic levels most of the cells lose their ability to accumulate lipids and the size of the lipid droplets is smaller. The levels of PPAR γ and perilipin are only slightly decreased. By contrast SREBP1-c, a transcription factor that controls lipogenesis in adipocytes is totally inhibited. This could explain why, even if some adipocyte marker genes are not drastically modified, lipid accumulation is decreased. This also suggests that inhibition of HDAC6 inhibits adipocyte through two different mechanisms: one dependent on the first days of differentiation, and the other, more potent, which is triggered after the elongation of the cilium.

We then tested the effect of tubacin on the size of the primary cilium. Confluent hASC were treated or not for three days with tubacin, the differentiation medium (Mix) or both together. Cells were fixed, the primary cilium was detected by immunocytochemistry using anti-acetylated α -tubulin antibody and cilia were measured (Fig. 7). Control cells display a primary cilium the size of which was not significantly modified by tubacin (3.44 ± 0.08 and 3.11 ± 0.09 μ m respectively). As previously observed, hASC treated with the differentiation medium have longer cilia (7.83 ± 0.34 μ m) than control hASC. Tubacin blunted the increase in the cilium size (5.43 ± 0.17 μ m with $p < 0.001$ compared to the "MIX" condition).

Thus, the inhibition of HDAC6 results in an inhibition of adipocyte differentiation and a decrease in the primary cilium elongation, through a mechanism that is not dependent of the glucocorticoid receptor.

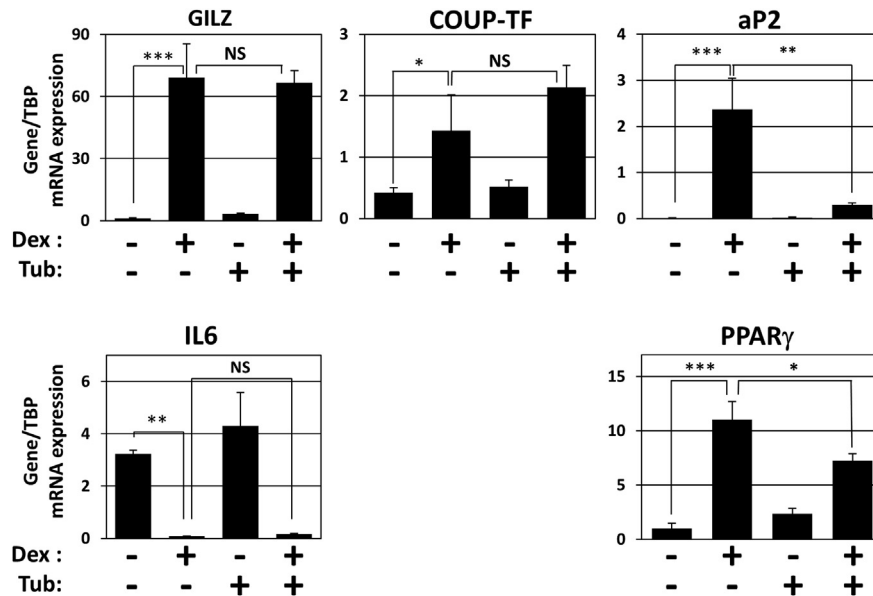


Fig. 5. hASC were treated for 3 days with, or without dexamethasone (Dex; 1 μ M) in presence, or in absence, of 5 μ M tubacin (Tub). RNAs were extracted and gene expression was assessed using quantitative RT-PCR. The figure is representative of 3 independent experiments performed in triplicate. An ANOVA was performed to analyze statistically differences between groups *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.001$, NS: non-significant.

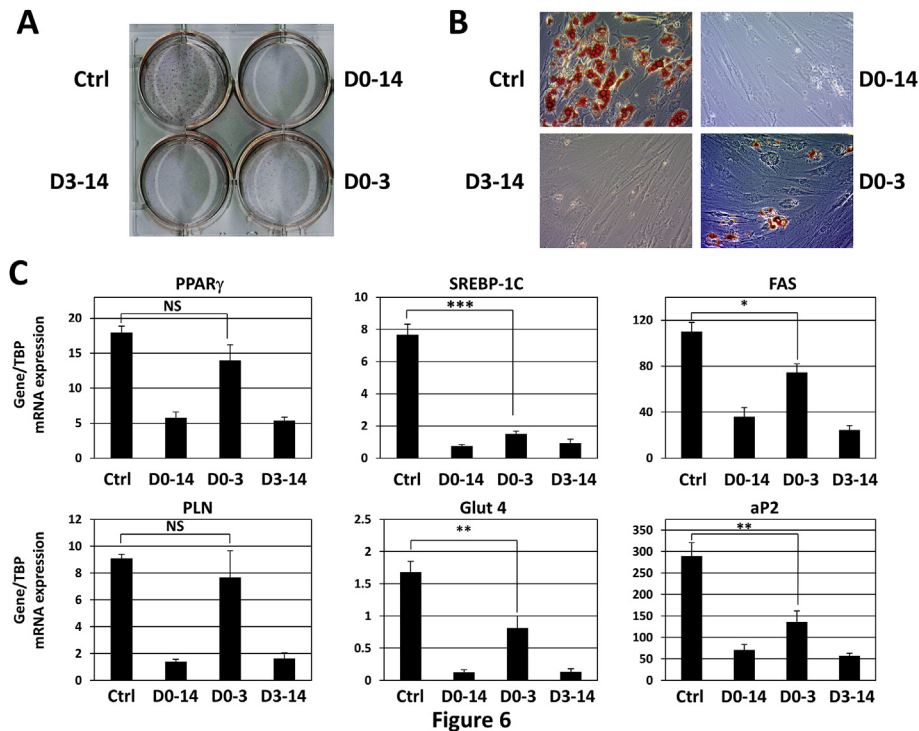


Fig. 6. hASC were differentiated without (Ctrl) or with 5 μ M tubacin during day 0 to day 14 (D0-14) day 3 to day 14 (D3-14) or day 0 to day 3 (D0-3). A) cells were fixed and stained with oil red O B) picture were taken with an inverted phase contrast zeiss PrimoVert microscope C) RNAs were extracted and expression of PPAR γ , SREBP1-C, FAS, PLN, GLUT4 and aP2 were measured using quantitative RT-PCR. The figure is representative of three independent experiments performed in triplicate. A t-test was performed to analyze statistically differences between conditions *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.001$ NS: non-significant.

3.4. HDAC6 overexpression interferes with the cilium elongation and inhibits adipocyte differentiation

Since HDAC6 is upregulated during adipocyte differentiation and has been shown to be responsible for the loss of the cilium we investigated the effect of an overexpression of HDAC6 on hASC.

hASC-Control and hASC overexpressing HDAC6 (hASC-HDAC6) were produced as described in Material and Methods. As expected, the levels of HDAC6 RNA (Fig. 8A) and protein (Fig. 8E) were higher in hASC-HDAC6 than in hASC-Control. The homogeneity of HDAC6 expression in the cell culture was verified by immunocytochemistry (supplementary Fig. 1). To verify that the transgene was active we

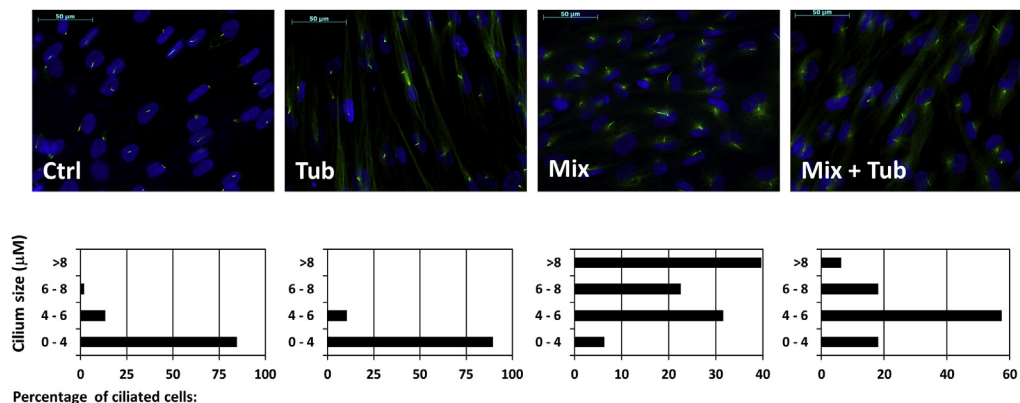


Fig. 7. hASC were treated for three days with (Mix) or without (Ctrl) the differentiation medium in presence or in absence of tubacin (Tub). Acetylated α -tubulin (in green) was revealed by immunocytochemistry. Nuclei were stained with Hoechst 33258. Cilia were measured. The percentages of cilia belonging in each class size are represented in the histograms. This figure is representative of three independent experiments. Difference between conditions Ctrl-Mix, Mix-Mix + Tub, Ctrl-Mix + Tub was significant with $p < 0.001$.

compared the level of α -acetylated tubulin in hASC-Control, in hASC-HDAC6 in undifferentiated and differentiated (12 days) conditions. As observed, (Fig. 8E) the level of acetylated α -tubulin was lower in hASC-HDAC6 cells than in the control, indicating that the enzyme is active. Notably, the level of acetylated α -tubulin in undifferentiated hASC-HDAC6 was similar to the one in differentiated hASC-Control.

hASC are characterized by their abilities to form clones, to proliferate and to differentiate. Comparison of hASC-HDAC6 and hASC-Control clonogenicity (Fig. 8B) and proliferation (Fig. 8C) indicates that both cell lines behave similarly in this regard. We then analyzed the effect of HDAC6 overexpression on hASC differentiation. As observed in the Western blot (Fig. 8E) the levels of perilipin were lower in hASC-HDAC6 than in hASC-Control. Light microscopy analysis shown that under undifferentiated conditions hASC-HDAC6 and hASC-Control were undistinguishable (Fig. 8D). By contrast, under differentiation conditions less differentiated cells were observed in hASC-HDAC6 than in hASC-Control. We then analyzed the expression of several adipocyte markers; PPAR γ , SREBP1c and ACC (Fig. 8F). No significant difference was observed between the two cells line before day 7. By contrast, by day seven a decrease in adipocyte markers was observed in hASC-HDAC6 cells, indicating that overexpression of HDAC6 inhibits hASC differentiation. We analyzed two genes associated with the primary cilium; KIF3a and IFT88 (intraflagellar transport 88). IFT88 expression decreases during adipocyte differentiation while KIF3a was not significantly modified in both cell lines.

We studied if the overexpression of HDAC6 affects the activity of the glucocorticoid receptor. To do this, we compared the induction of GILZ, COUP-TF, IL6 and aP2 after a three-days treatment of dexamethasone in hASC-Control and hASC-HDAC6 (Fig. 9). As observed, HDAC6 overexpression did not modify the expression of IL6, COUP-TF and GILZ. By contrast, aP2 induction by dexamethasone was inhibited in hASC-HDAC6 compared to hASC-Control. These results show that overexpression of HDAC6 inhibits adipocyte differentiation without affecting the global activity of the glucocorticoid receptor.

We compared the primary cilium during adipocyte differentiation in hASC-HDAC6 and in hASC-Control. Cells were differentiated for 14 days and analyzed by immunochemistry with anti-acetylated α -tubulin (green) and perilipin (red) antibodies (Fig. 10A). The percentage of cells displaying a primary cilium was measured (Fig. 10B). At day 0 around 70% of hASC-HDAC6 and hASC-Control are ciliated. This percentage decreases in hASC-Control during adipogenesis, as already reported. By contrast, hASC-HDAC6 does

not lose their cilium after treatment with an adipogenic medium. This is consistent with the observation that hASC-HDAC6 are resistant to differentiation.

The size of the cilia (Fig. 10C) was measured. At day 0, hASC-HDAC6 and hASC-Control exhibit cilia of similar length ($2.71 \pm 1.04 \mu\text{m}$ and $2.371 \pm 0.68 \mu\text{m}$ respectively). In hASC-Control, the size of the cilia increases sharply after 3 days of differentiation with nearly 40% of the cilia longer than $6 \mu\text{m}$ and a mean size of $4.79 \pm 2.08 \mu\text{m}$. Then, the size decreases until day 14 to $3.13 \pm 1.83 \mu\text{m}$. In hASC-HDAC6 the cilium elongation after 3 days is blunted, compared to hASC-Control, with less than 10% of cilia longer than $6 \mu\text{m}$ and a mean size of $3.95 \pm 2.08 \mu\text{m}$ (with $p < 0.05$ between the two conditions). Interestingly, no significant modification is observed after 7 days ($4.13 \pm 1.81 \mu\text{m}$), but after 14 days, the cilium decreases dramatically in size ($1.55 \pm 0.63 \mu\text{m}$).

These results indicate that overexpression of HDAC-6 reduces the elongation of the cilium, but is not sufficient for the loss of the cilium. This is associated with an inhibition of adipocyte differentiation that is independent of an effect on the glucocorticoid receptor.

3.5. HDAC-6 and ATAT1 expression are not significantly modified during obesity

Since HDAC activity is highly regulated during adipocyte differentiation we compared the expression of HDAC6 and ATAT1 (the α -tubulin acetylase) in human native progenitor cells isolated from adipose tissue of lean (body mass index (BMI) < 25), overweight ($25 < \text{BMI} < 30$) and obese donors (BMI > 30). CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells were obtained from adipose tissue after enzymatic digestion and immunoselection/depletion [24]. HDAC6 and ATAT expression was assessed using quantitative RT-PCR. As observed in Fig. 11, the levels of expression of HDAC6 and ATAT1 were similar in all conditions tested.

4. Discussion

The primary cilium is emerging as a signaling organelle involved in many critical biological processes [35]. In particular, the primary cilium appears an important player in the regulation of metabolism and energy homeostasis [36]. The obesity of patients suffering from Bardet Biedl syndrome [3], the observations that the cilium varies in length during adipogenesis [7,11,12] and the phenotypes of adipose cells in which cilia proteins are invalidated (although providing apparently conflicting results) [7–10], indicate a role for

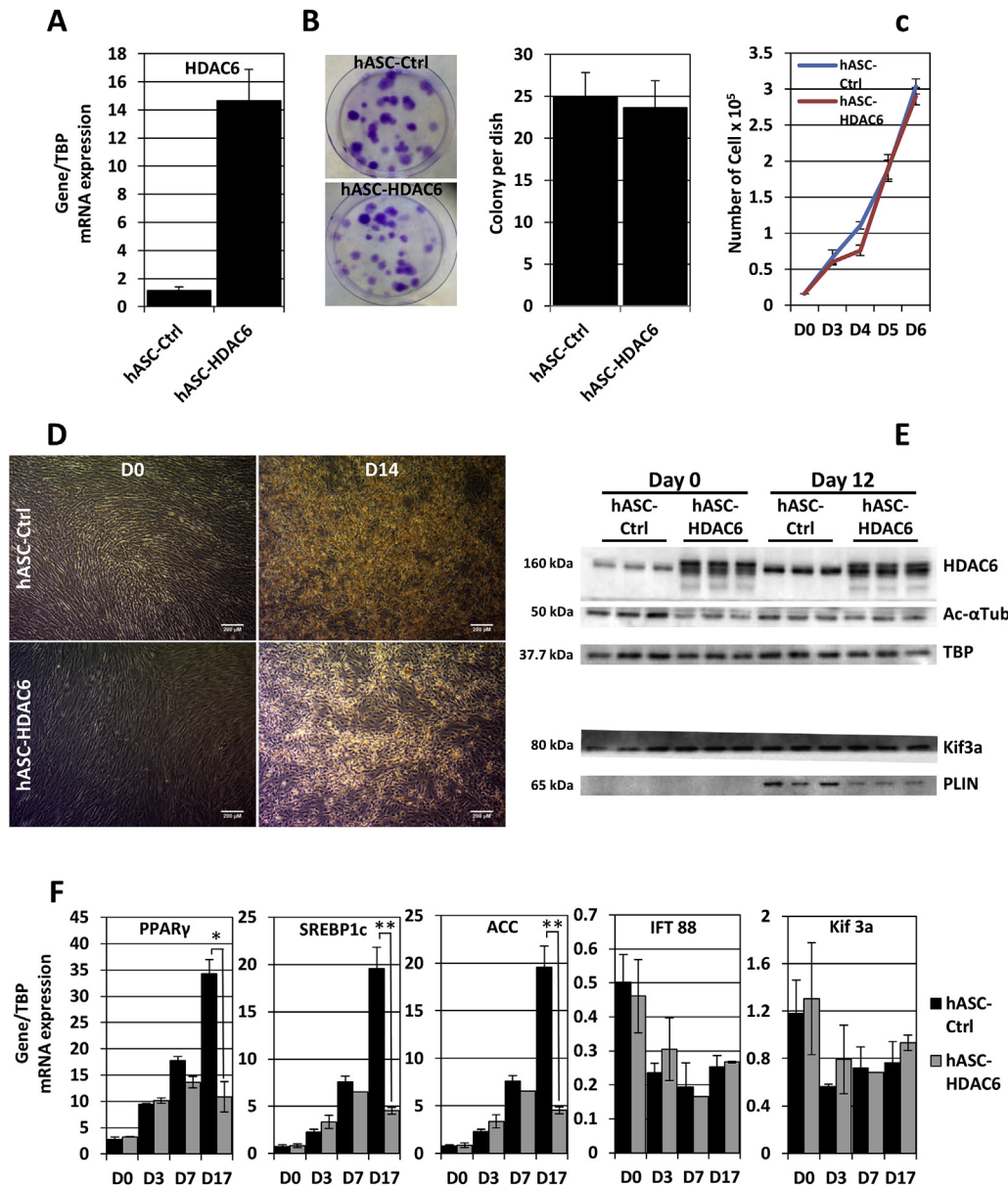


Fig. 8. A) RNAs were extracted from hASC-Control and hASC-HDAC6 and HDAC6 expression was measured by quantitative RT-PCR. B) The clonogenicity of hASC-HDAC6 and hASC-Control was analyzed as described in the Material and Methods. Pictures of the dishes are shown and a quantification of three different dishes is provided. C) Proliferation of hASC-HDAC6 and hASC-Control was analyzed during 6 days. D) hASC-HDAC6 and HDAC6 were differentiated (day 14) or not (day 0). Light microscopy pictures are presented. E) hASC-HDAC6 and hASC-Control were differentiated (day 12) or not. Cells were lysed and Western blot were performed on 10 μ g, for HDAC6, acetylated α tubulin (ac- α tubulin) and TBP (TATA box binding protein), or 5 μ g, for perilipin (PLIN) and Kif3a, of cell lysate. For each condition triplicates were loaded on the gel. F) hASC-Control and hASC-HDAC6 were differentiated for 17 days. At different time points (0, 3, 7 and 17 days) RNA were extracted and expression of selected genes was measured using quantitative RT-PCR. The inhibition of differentiation is representative of three independent experiments. A t-test was performed to analyze statistically differences between the levels of gene expression in hASC-Ctrl and hASC-HDAC6. *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$.

the primary cilium in adipogenesis. The precise details of the function of the cilium in adipogenesis remain unclear.

We have investigated the functions of HDAC6 during adipocyte differentiation of hASC. HDAC6 belongs to the class II of the HDAC family [37,38]. HDAC6 deacetylates α -tubulin, a process that leads, among other things, to the loss of the primary cilium. HDAC6 has also been shown to deacetylate hsp90 [33,37] but does not deacetylate histone *in vivo* [37]. This enzyme is involved in various biological processes such as cell migration, degradation of misfolded proteins, cell–cell interaction, tumor growth and development. Knock-out mice for HDAC6 are viable with minor defects in the immune response and bone homeostasis [39]. This is

interesting since osteoblasts and adipocytes share similar progenitors. However, to the best of our knowledge the adipose tissue of these mice has not been studied in details. HDAC6 is involved in all the well-known models of a loss of the cilium; mitosis, heat shock, and cancer; (i) during mitosis, an association between HEF1/Cas-L/NEDD9 and the mitotic-regulated kinase Aurora A causes phosphorylation and activation of HDAC6. HDAC6 disassembled the cilium through α -tubulin deacetylation [16] (ii) Heat shock induces a resorption of the primary cilium through a mechanism dependent of HDAC6 [17] (iii) HDAC6 overexpression, and a loss of the primary cilium, are observed in several types of cancers [40,41]. In cholangiocarcinoma the loss of the cilium has been directly associated

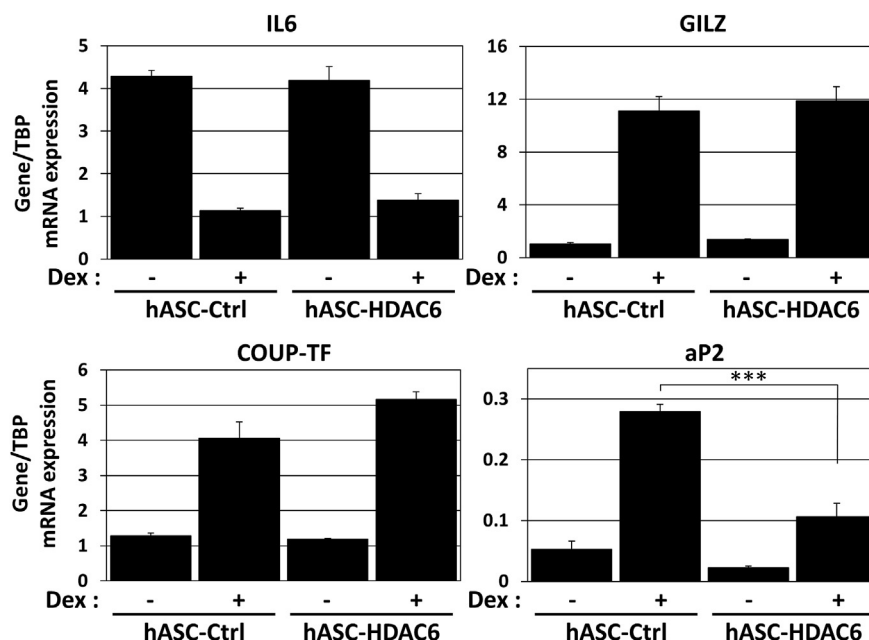


Fig. 9. hASC-Control and hASC-HDAC6 were treated for three days with (Dex), or without (Ctrl), dexamethasone (1 μ M). RNAs were extracted and gene expression was measured using quantitative RT-PCR. The experiment was performed in triplicate. A t-test was performed to analyze statistically differences between conditions. ***: $p < 0.001$.

with an overexpression of HDAC6 [18]. Inhibition of HDAC6 in these cells restores the primary cilium and decreases the tumorigenicity of the cells.

4.1. Cilium length, acetylated α -tubulin and HDAC6 expression vary during adipocyte differentiation

We show here that acetylated α -tubulin levels vary during differentiation of hASC cells. It increases during the first days of differentiation, concomitantly with cilium lengthening, then returns to its basal levels, while the primary cilium disappears. These observations are somehow different with what has been described in 3T3L1 cells where levels of acetylated α -tubulin increases sharply along adipocyte differentiation [42]. This discrepancy could be linked to the difference in the cells lines used, 3T3-L1 being aneuploids rodent cells. What could regulate this modulation? HDAC6 expression increases during adipocyte differentiation. This is in agreement with the study of Huang et al. who showed that, in hASC, the increase in HDAC-6 during adipocyte differentiation is linked to a regulation of miR-22 [26]. This increase in expression could explain the decrease in acetylated α -tubulin observed during days 3 to day 14. Moreover, the observation that cells that express the more HDAC6 during adipocyte differentiation are the one that lose their primary cilium corroborates the notion that HDAC6 is associated with a loss of the cilium. However, the increase in HDAC6 expression cannot explain the early increase in acetylated α -tubulin. The best known tubulin acetylase is ATAT-1 [29]. We have not detected any significant modulation of its expression during adipocyte differentiation. However, a modulation of its activity, or of other acetylase, cannot be ruled out.

4.2. Inhibition of HDAC6 decreases the lengthening of the cilium during adipocyte differentiation and inhibits adipocyte differentiation

Tubacin is a specific inhibitor of HDAC6 with no activity for other HDAC [31]. Tubacin increases the levels of acetylated α -tubulin and decreases the lengthening of the cilium during the first days of

differentiation. There could be several explanations for this phenomenon. First, it has been observed that tubacin reduces the growth rate and shrinkage of microtubules [43]. Since the axonem of the primary cilium is composed of 9 doublets of microtubules it could be envisioned that the increase in cilium size is delayed through inhibition of the growth rate of microtubules. Secondly, it could be hypothesized that the increase in the cilium size in the first days of differentiation is an intrinsic event of adipogenesis. Inhibition of adipocyte differentiation by tubacin, through a mechanism that remain to be identified, would be associated with a diminished cilium lengthening.

So, how does inhibition of HDAC6 inhibits adipocyte differentiation? The experiment demonstrating the absence of effect of tubacin on dexamethasone induced-gene suggests that this inhibition is not linked to a general inhibition of the glucocorticoid receptor through the regulation of hsp90. The inhibition observed with tubacin is consistent with the study showing that siRNA against HDAC6 inhibits adipocyte differentiation [26]. In this study, Huang et al. hypothesized that HDAC6 inhibits Runx-2, a master gene in osteoblast differentiation. Thus, inhibition of adipocyte differentiation could be the result of a stimulation of osteoblast differentiation, a phenomenon previously described [32]. However, this hypothesis is in conflict with the original study of Westendorf et al. who showed that HDAC6 cooperate positively with Runx-2 [44]. We did not observe significant modulation of osteoblastic markers suggesting that Runx-2 is not involved in this process. If the increase in the cilium size is a necessary early event for adipocyte differentiation the inhibition of this lengthening by tubacin could inhibit adipogenesis. It can also be argued that HDAC6 controls several processes during adipocyte differentiation. This is supported by the observation that inhibition of HDAC6, only during early differentiation or late differentiation, inhibits adipocyte differentiation but with a different pattern.

4.3. The overexpression of HDAC-6 inhibits adipocyte differentiation

Overexpression of HDAC6 in hASC decreased the levels of acetylated α -tubulin and the elongation of the cilium during the

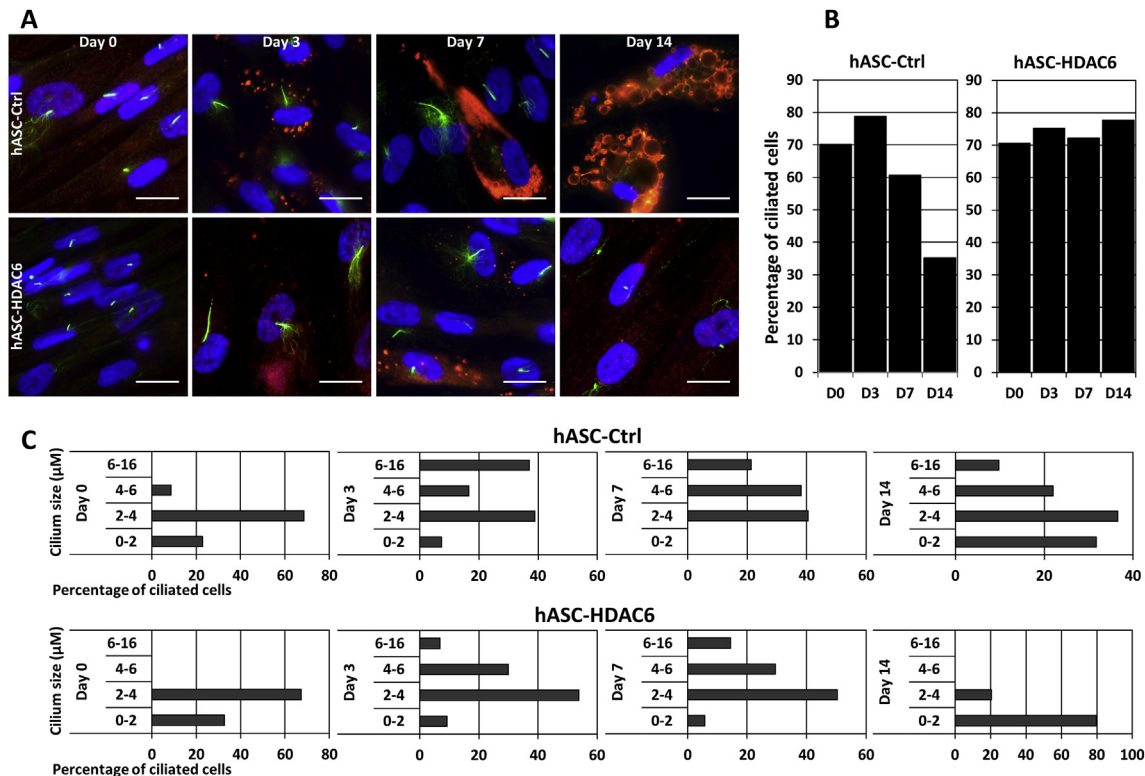


Fig. 10. hASC-HDAC6 and HDAC6 were differentiated for 14 days. A) At day 0, 3, 7 and 14 acetylated α -tubulin (in green) and perilipin (red) were revealed by immunocytochemistry. Nuclei were stained with Hoechst 33258. B) The percentage of ciliated cells was evaluated. C) Cilia were measured. The percentages of cilia belonging in each class size are represented in the histograms.

first days of differentiation. Interestingly, although they express similar levels of acetylated α -tubulin differentiated hASC-Control exhibits a cilium while hASC-HDAC6 does not. This indicates that while HDAC6 is necessary for the loss of the cilium it is not sufficient. This is different to what has been observed during mitosis and cancer, where activation of HDAC6 is sufficient for the loss of the cilium. SREBP1c, a transcription factor the expression of which

increases during adipocyte differentiation, has been demonstrated to be overexpressed in some cancers cells and leads to a loss of the cilium [45]. It could be envisioned that HDAC6 and SREBP1c cooperate to induce a loss of the cilium during adipogenesis.

Overexpression of HDAC6 inhibits adipocyte differentiation. This is independent of an effect of HDAC6 on the glucocorticoid receptor. This is consistent with experiments where expression of a

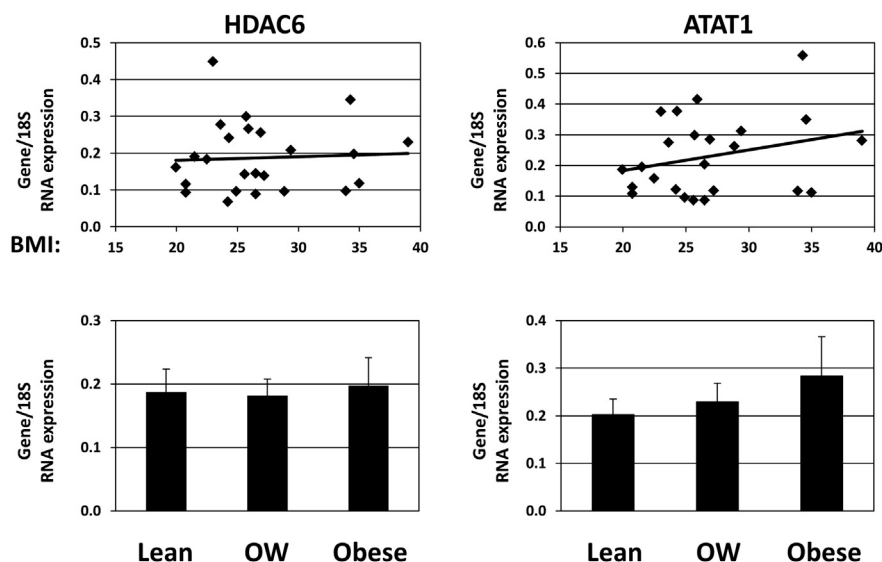


Fig. 11. CD45-/CD34+/CD31- progenitor cells were obtained from patient with various BMI. Total RNAs were extracted and HDAC6 and ATAT1 expression were measured using quantitative RT-PCR. Scatter plots are provided in upper panels. Means of expression of lean (BMI < 25), overweight (25 ≤ BMI < 30) OW and obese (BMI ≥ 30) are provided in the lower panels.

mutant of α -tubulin, resistant to acetylation or, inhibition of the tubulin acetylase, ATAT1, inhibits adipocyte differentiation [42]. Several mechanisms could be envisioned. For instance, HDAC6 regulates autophagy, a process necessary for adipocyte differentiation [46]. Acetylated α -tubulin has also been shown to control the rearrangement of membrane and of the cytoskeleton, which are known to be modulated during adipocyte differentiation. Acetylated α -tubulin is also involved in the spreading of the endoplasmic reticulum which allows association with mitochondria, a process important, for instance, for lipid synthesis [47]. Finally, if the elongation of the primary cilium is an early event necessary for adipocyte differentiation, the inhibition of this elongation by HDAC6 overexpression would result in an inhibition of adipogenesis.

4.4. HDAC6 activity has to be finely tuned during adipocyte differentiation

It is peculiar that both the inhibition, and the overexpression, of HDAC6 lead to a decrease in adipocyte differentiation of hASC and the elongation of the cilium. This indicates that the levels of acetylated α -tubulin have to be finely tuned in order to allow an optimal adipocyte differentiation. Since HDAC6 has been involved in several cancer cells it is considered as a new target for drug development [37,48]. The side effect of these drugs on fat mass (which is already challenged, especially in the state of cachexia associated with cancer) should be carefully monitored during clinical trials.

In summary, we show here that during the early stage of differentiation the level of acetylated α -tubulin and the length of the primary cilium increase transiently. Both events appear to be causally linked and could be necessary for adipogenesis. Although the expression of HDAC6 increases during adipogenesis it is not sufficient for the loss of the primary cilium in adipocyte. An increase, or a decrease, of HDAC6 activity results in an inhibition of adipocyte differentiation through a mechanism which is likely dependent upon acetylated α -tubulin. Together, these results shed new light on the regulation of the primary cilium and on the function of HDAC6 and acetylated α -tubulin during adipocyte differentiation.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Société Française du Diabète (SFD), by the French Government INSERM, CNRS and ANR through the « Investments for the Future » LABEX SIGNALIFE: program reference # ANR-11-LABX-0028-01. We are grateful to Drs. A. Ladoux and S. Giorgetti-Peraldi for helpful comments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.011>.

References

- [1] P. Arner, D.P. Andersson, A. Thorne, M. Wren, J. Hoffstedt, E. Naslund, A. Thorell, M. Ryden, Variations in the size of the major omentum are primarily determined by fat cell number, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98 (2013) E897–E901.
- [2] E. Jeffery, C.D. Church, B. Holtrup, L. Colman, M.S. Rodeheffer, Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity, *Nat. Cell Biol.* 4 (2015) 376–385.
- [3] G. Novarino, N. Akizu, J.G. Gleeson, Modeling human disease in humans: the ciliopathies, *Cell* 147 (2011) 70–79.
- [4] D. Girard, N. Petrovsky, Alstrom syndrome: insights into the pathogenesis of metabolic disorders, *Nat. Rev. Endocrinol.* 7 (2011) 77–88.
- [5] A. Shalata, M.C. Ramirez, R.J. Desnick, N. Priedigkeit, C. Buettner, C. Lindtner, M. Mahroum, M. Abdul-Ghani, F. Dong, N. Arar, O. Camacho-Vanegas, R. Zhang, S.C. Camacho, Y. Chen, M. Ibdah, R. DeFronzo, V. Gillespie, K. Kelley, B.D. Dynlacht, S. Kim, M.J. Gluckman, Z.U. Borochowitz, J.A. Martignetti, Morbid obesity resulting from inactivation of the ciliary protein CEP19 in humans and mice, *Am. J. Hum. Genet.* 93 (2013) 1061–1071.
- [6] K. Rahmouni, M.A. Fath, S. Seo, D.R. Thedens, C.J. Berry, R. Weiss, D.Y. Nishimura, V.C. Sheffield, Leptin resistance contributes to obesity and hypertension in mouse models of Bardet-Biedl syndrome, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 1458–1467.
- [7] V. Marion, C. Stoetzel, D. Schlicht, N. Messaddeq, M. Koch, E. Flori, J.M. Danse, J.L. Mandel, H. Dollfus, Transient ciliogenesis involving Bardet-Biedl syndrome proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 1820–1825.
- [8] I. Huang-Doran, R.K. Semple, Knockdown of the Alstrom syndrome-associated gene *Alms1* in 3T3-L1 preadipocytes impairs adipogenesis but has no effect on cell-autonomous insulin action, *Int. J. Obes. (Lond)* 34 (2010) 1554–1558.
- [9] N. Qiu, L. Cao, V. David, L.D. Quarles, Z. Xiao, Kif3a deficiency reverses the skeletal abnormalities in *Pkd1* deficient mice by restoring the balance between osteogenesis and adipogenesis, *PLoS One* 5 (2010) e15240.
- [10] D. Zhu, S. Shi, H. Wang, K. Liao, Growth arrest induces primary-cilium formation and sensitizes IGF-1-receptor signaling during differentiation induction of 3T3-L1 preadipocytes, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 2760–2768.
- [11] N. Forcioli-Conti, S. Lacas-Gervais, C. Dani, P. Peraldi, The primary cilium undergoes dynamic size modifications during adipocyte differentiation of human adipose stem cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458 (2015) 117–122.
- [12] M.T. Dalbay, S.D. Thorpe, J.T. Connelly, J.P. Chapple, M.M. Knight, Adipogenic differentiation of hMSCs is mediated by recruitment of IGF-1R onto the primary cilium associated with cilia elongation, *Stem Cells* 6 (2015) 1952–1961.
- [13] H. Ishikawa, W.F. Marshall, Ciliogenesis: building the cell's antenna, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (2011) 222–234.
- [14] J.R. Davenport, B.K. Yoder, An incredible decade for the primary cilium: a look at a once-forgotten organelle, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 289 (2005) F1159–F1169.
- [15] N.F. Barberi, A.K. O'Connor, C.J. Haycraft, B.K. Yoder, The primary cilium as a complex signaling center, *Curr. Biol.* 19 (2009) R526–R535.
- [16] E.N. Pugacheva, S.A. Jablonski, T.R. Hartman, E.P. Henske, E.A. Golemis, HEF1-dependent aurora A activation induces disassembly of the primary cilium, *Cell* 129 (2007) 1351–1363.
- [17] N.V. Prodromou, C.L. Thompson, D.P. Osborn, K.F. Cogger, R. Ashworth, M.M. Knight, P.L. Beales, J.P. Chapple, Heat shock induces rapid resorption of primary cilia, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 4297–4305.
- [18] S.A. Gradilone, B.N. Radtke, P.S. Bogert, B.Q. Huang, G.B. Gajdos, N.F. LaRusso, HDAC6 inhibition restores ciliary expression and decreases tumor growth, *Cancer Res.* 73 (2013) 2259–2270.
- [19] A.M. Rodriguez, C. Elabd, F. Delteil, J. Astier, C. Vernochet, P. Saint-Marc, J. Guesnet, A. Guezennec, E.Z. Amri, C. Dani, G. Ailhaud, Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (2004) 255–263.
- [20] W. Fischle, S. Emiliani, M.J. Hendzel, T. Nagase, N. Nomura, W. Voelter, E. Verdin, A new family of human histone deacetylases related to saccharomyces cerevisiae HDA1p, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 11713–11720.
- [21] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods* 9 (2012) 676–682.
- [22] R.L. Morris, H.W. Pope, A.N. Sholi, L.M. Williams, C.R. Ettinger, G.M. Beacham, T. Shintaku, Z.D. Abbott, E.M. Doherty, Methods for imaging individual cilia in living echinoid embryos, *Methods Cell Biol.* 127 (2015) 223–241.
- [23] C. Fontaine, W. Cousin, M. Plaisant, C. Dani, P. Peraldi, Hedgehog signaling alters adipocyte maturation of human mesenchymal stem cells, *Stem Cells* 26 (2008) 1037–1046.
- [24] D. Esteve, N. Boulet, F. Volat, A. Zakaroff-Girard, S. Ledoux, M. Coupaye, P. Decaunes, C. Belles, F. Gaits-Iacovoni, J.S. Iacovoni, A. Remaury, B. Castel, P. Ferrara, C. Heymes, M. Lafontan, A. Bouloumie, J. Galitzky, Human White and Brite adipogenesis is supported by MSCA1 and is impaired by immune cells, *Stem Cells* 33 (2015) 1277–1291.
- [25] C. Hubbert, A. Guardiola, R. Shao, Y. Kawaguchi, A. Ito, A. Nixon, M. Yoshida, X.F. Wang, T.P. Yao, HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase, *Nature* 417 (2002) 455–458.
- [26] S. Huang, S. Wang, C. Bian, Z. Yang, H. Zhou, Y. Zeng, H. Li, Q. Han, R.C. Zhao, Upregulation of miR-22 promotes osteogenic differentiation and inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by repressing HDAC6 protein expression, *Stem Cells Dev.* 21 (2012) 2531–2540.
- [27] B.M. Spiegelman, S.R. Farmer, Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes, *Cell* 29 (1982) 53–60.
- [28] B.J. North, B.L. Marshall, M.T. Borra, J.M. Denu, E. Verdin, The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase, *Mol. Cell* 11 (2003) 437–444.
- [29] J.S. Akella, D. Wloga, J. Kim, N.G. Starostina, S. Lyons-Abbott, N.S. Morrisette, S.T. Dougan, E.T. Kipreos, J. Gaertig, MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase, *Nature* 467 (2010) 218–222.

- [30] A. Sanchez de Diego, A. Alonso Guerrero, A.C. Martinez, K.H. van Wely, Dido3-dependent HDAC6 targeting controls cilium size, *Nat. Commun.* 5 (2014) 3500.
- [31] S.J. Haggarty, K.M. Koeller, J.C. Wong, C.M. Grozinger, S.L. Schreiber, Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 4389–4394.
- [32] M.E. Nuttall, F. Shah, V. Singh, C. Thomas-Porch, T. Frazier, J.M. Gimble, Adipocytes and the regulation of bone remodeling: a balancing act, *Calcif. Tissue Int.* 94 (2014) 78–87.
- [33] J.J. Kovacs, P.J. Murphy, S. Gaillard, X. Zhao, J.T. Wu, C.V. Nicchitta, M. Yoshida, D.O. Toft, W.B. Pratt, T.P. Yao, HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor, *Mol. Cell* 18 (2005) 601–607.
- [34] M.C. Monteiro, M. Sanyal, M.L. Cleary, C. Sengenès, A. Bouloumie, C. Dani, N. Billon, PBX1: a novel stage-specific regulator of adipocyte development, *Stem Cells* 29 (2011) 1837–1848.
- [35] E.C. Oh, N. Katsanis, Cilia in vertebrate development and disease, *Development* 139 (2012) 443–448.
- [36] E.C. Oh, S. Vasanth, N. Katsanis, Metabolic regulation and energy homeostasis through the primary cilium, *Cell Metab.* 21 (2015) 21–31.
- [37] O.H. Kramer, S. Mahboobi, A. Sellmer, Drugging the HDAC6-HSP90 interplay in malignant cells, *Trends Pharmacol. Sci.* 35 (2014) 501–509.
- [38] A. Valenzuela-Fernandez, J.R. Cabrero, J.M. Serrador, F. Sanchez-Madrid, HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions, *Trends Cell Biol.* 18 (2008) 291–297.
- [39] Y. Zhang, S. Kwon, T. Yamaguchi, F. Cubizolles, S. Rousseaux, M. Kneissel, C. Cao, N. Li, H.L. Cheng, K. Chua, D. Lombard, A. Mizeracki, G. Matthias, F.W. Alt, S. Khochbin, P. Matthias, Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally, *Mol. Cell Biol.* 28 (2008) 1688–1701.
- [40] E.J. Michaud, B.K. Yoder, The primary cilium in cell signaling and cancer, *Cancer Res.* 66 (2006) 6463–6467.
- [41] O.V. Plotnikova, E.A. Golemis, E.N. Pugacheva, Cell cycle-dependent cilio-genesis and cancer, *Cancer Res.* 68 (2008) 2058–2061.
- [42] W. Yang, X. Guo, S. Thein, F. Xu, S. Sugii, P.W. Baas, G.K. Radda, W. Han, Regulation of adipogenesis by cytoskeleton remodelling is facilitated by acetyltransferase MEC-17-dependent acetylation of alpha-tubulin, *Biochem. J.* 449 (2013) 605–612.
- [43] Y. Zilberman, C. Ballestrem, L. Carramusa, R. Mazitschek, S. Khochbin, A. Bershadsky, Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 3531–3541.
- [44] J.J. Westendorf, S.K. Zaidi, J.E. Cascino, R. Kahler, A.J. van Wijnen, J.B. Lian, M. Yoshida, G.S. Stein, X. Li, Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter, *Mol. Cell Biol.* 22 (2002) 7982–7992.
- [45] N. Willemarck, E. Rysman, K. Brusselmans, G. Van Imschoot, F. Vanderhoydonc, K. Moerloose, E. Lerut, G. Verhoeven, F. van Roy, K. Vleminckx, J.V. Swinnen, Aberrant activation of fatty acid synthesis suppresses primary cilium formation and distorts tissue development, *Cancer Res.* 70 (2010) 9453–9462.
- [46] R. Singh, Y. Xiang, Y. Wang, K. Baikati, A.M. Cuervo, Y.K. Luu, Y. Tang, J.E. Pessin, G.J. Schwartz, M.J. Czaja, Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 3329–3339.
- [47] D. Perdiz, R. Mackeh, C. Pous, A. Baillet, The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification? *Cell Signal* 23 (2011) 763–771.
- [48] P.H. Yang, L. Zhang, Y.J. Zhang, J. Zhang, W.F. Xu, HDAC6: physiological function and its selective inhibitors for cancer treatment, *Drug Discov. Ther.* 7 (2013) 233–242.

III. Discussion des deux articles

Le cil primaire a pendant longtemps été considéré comme une organelle vestigiale. Depuis la découverte de son implication dans différentes voies de signalisations, son étude a suscité un regain d'intérêt de la communauté scientifique. Les différents modèles d'animaux, ou de cellules, ont pu mettre en lumière son implication dans le développement de l'obésité chez les patients atteints de ciliopathie, dont l'origine semble être à la fois dû à une composante comportementale, et à une perturbation de la régulation des progéniteurs adipeux.

Notre première étude a pu montrer de façon claire que le cil primaire des progéniteurs adipeux humains sains subissait différentes modifications au cours de la différenciation adipocytaire. Il est présent dans les progéniteurs indifférenciés, puis il est perdu dans les adipocytes chargés en lipides. Entre ces deux états le cil primaire subit une forte élongation, puis se rétracte pour disparaître tardivement.

Les rôles du cil primaire au cours de la différenciation adipocytaire sont aujourd'hui encore discutés. Les travaux portant sur l'étude des protéines BBS tendent à montrer que les perturbations du cil primaire favorisent la différenciation adipocytaire, alors que d'autres travaux portant sur l'étude du gène *Alms1* ou *IFT88* dans les 3T3-L1 indiquent qu'elles engendrent une diminution de la capacité de différenciation (Ansley et al., 2003; Huang-Doran and Semple, 2010). Ces résultats peuvent s'expliquer par l'implication du cil dans une multitude de fonctions régulées différemment au cours de l'adipogenèse. Après trois jours de différenciation, lorsque le cil est plus long, nous avons observé l'apparition d'une résistance au ligand Sonic Hedgehog. Cependant, nous n'avons jamais observé de variation de la localisation de Smo ces mêmes trois jours. Smo ne semble donc pas être impliqué dans l'apparition de cette résistance indiquant qu'un autre mécanisme doit en être responsable. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que l'élongation du cil soit directement responsable de cette perte de sensibilité à Hedgehog. En effet le cil apparaît comme étant un espace de concentration des différents acteurs de la voie. Ainsi on peut émettre l'hypothèse qu'une forte élongation du cil provoque une dilution des acteurs de la voie Hedgehog, ce qui aboutirait à une diminution de la réponse engendrée par la présence du ligand. Néanmoins, il reste difficile d'après nos travaux

de généraliser cette observation aux autres voies contrôlées par le cil primaire qu'elles soient antiadipogéniques (Wnt, TGF) ou proadipogéniques (IGF-1) (Zhu et al., 2009).

Par la suite, nous avons cherché à comprendre les raisons de la perte du cil lors de la différenciation adipocytaire. L'étude du rôle d'HDAC6 nous est apparue indiquée puisque son expression est plus importante dans les cellules différenciées qu'au stade de progéniteurs. Nous avons pu observer que l'inhibition d'HDAC6 au cours de la différenciation conduit à une inhibition de la différenciation adipocytaire indépendamment de l'activité de la voie des glucocorticoïdes. Cette observation suggère que l'activité d'HDAC6 est nécessaire au cours de la différenciation. De plus son activité ne semble pas être régulée d'une façon particulière. En effet, les traitements à la tubacine sur différentes périodes conduisent toujours à une inhibition de la différenciation indiquant que l'activité de cette protéine est requise tout au long de la différenciation. Néanmoins, au vu de la diversité des processus dans lesquelles HDAC6 est engagée nous ne pouvons pas conclure que le rôle de cette enzyme soit uniquement dédié à la résorption du cil au cours de la différenciation adipocytaire. Enfin, bien que la tubacine soit fortement spécifique contre HDAC6, elle dispose tout de même d'une spécificité pour HDAC1 et HDAC4 quatre fois inférieure (Mai et al., 2005), or ces deux protéines ont été reconnues pour interférer avec la différenciation adipocytaire (Kuzmochka et al., 2014; Weems et al., 2012).

La surexpression d'HDAC6 au cours de la différenciation engendre une réduction de l'élongation du cil primaire, ainsi qu'une importante inhibition de la différenciation. Dans les cellules surexprimant HDAC6, le cil primaire est maintenu après 14 jours de différenciation. Cette observation n'est pas due à une perte des caractéristiques souches de notre modèle, puisque l'on n'observe aucun changement entre les lignées hASC-Ctrl et hASC-HDAC6 au niveau de leur prolifération et de leur capacité à proliférer à l'état clonal. De plus nous avons constaté que la capacité de différenciation ostéoblastique des cellules hASC-HDAC6 est conservée. L'incapacité des cellules à se différencier en adipocyte est donc bien engendrée par la surexpression d'HDAC6 de façon indépendante de la voie des glucocorticoïdes. Finalement, si l'élongation du cil primaire est un événement précoce et nécessaire pendant la différenciation adipocytaire, la perturbation de cette élongation par la surexpression ou l'inhibition d'HDAC6 engendrerait une inhibition de l'adipogenèse.

Les informations apportées par les modèles de souris invalidées pour HDAC6 ne nous permettent de confirmer le rôle de cette protéine au cours du développement du tissu adipeux puisqu'il n'a pas été étudié dans ces modèles (Zhang et al., 2008). Enfin, l'invalidation d' α TAT1 ne permet pas non plus de confirmer l'importance du niveau de tubuline acétylée dans le développement du tissu adipeux puisque ces souris présentent une perte importante du niveau de tubuline acétylée dans une grande majorité de tissu excepté le tissu adipeux blanc, les poumons et la rate (Kim et al., 2013). La conservation de l'acétylation de la tubuline dans certains des tissus de ces mutants peut être due à d'autres acétyltransférases de l' α -tubuline. Ainsi, on peut envisager que des protéines comme Ard1-Nat1, ELP3 et GCN5, qui sont connues pour être capable d'acétyler l' α -tubuline *in vitro* (Conacci-Sorrell et al., 2010; Creppe et al., 2009; Ohkawa et al., 2008)

IV. Les raisons de l'allongement du cil au cours de la différenciation adipocytaire

Comme nous avons pu le voir précédemment dans ce manuscrit, le cil primaire est une organelle extrêmement complexe sujette à un grand nombre de régulations tant au niveau de sa formation que de son maintien. De ce fait, les mécanismes impliqués dans la régulation de sa taille au cours de la différenciation peuvent être multiples. Toutefois, l'ensemble des données que nous avons obtenu tendent à montrer qu'HDAC6 est impliquée dans les variations de taille du cil. De plus nous avons observé que son activité ne semble pas être modulée pendant la différenciation des cellules.

On ne peut alors que s'interroger sur les causes de l'augmentation de l'acétylation de la tubuline après trois jours de différenciation si, à ce moment précis, l'expression d' α TAT1 et l'activité d'HDAC6 n'ont pas varié. On peut alors imaginer qu'HDAC6 est engagée dans un autre processus que celui de la régulation de l'acétylation de la tubuline, qui lui-même peut affecter la taille du cil primaire. Une recherche bibliographique, nous a conduits à nous intéresser à l'autophagie dans laquelle HDAC6 intervient et qui est un processus fortement impliqué au cours de l'adipogenèse et dans le contrôle de la taille du cil comme nous l'avons précédemment vu (Tang et al., 2013) (Lam et al., 2013).

L'autophagie est un processus constitutif de dégradation qui élimine les organelles non fonctionnelles ou redondant et les agrégats de protéines. L'autophagie est fortement activée en général en réponse à un stress non létal, permet de générer des nutriments intracellulaires ainsi que de l'énergie et d'éliminer les dommages cellulaires. Dans la plupart des cas, la stimulation de l'autophagie protège les cellules des agressions. En période de carence alimentaire, l'autophagie est un processus extrêmement important pour générer des métabolites et maintenir les niveaux d'ATP dans différents tissus comme cela peut être le cas dans le foie. À la naissance, suite à l'arrêt d'apports de nutriments maternels, l'autophagie permet au nouveau-né de s'adapter à ce brusque changement nutritionnel. L'autophagie a un rôle essentiel dans une multitude de processus physiologiques comme la différenciation cellulaire et le développement, le contrôle de qualité cellulaire, la suppression tumorale, l'immunité adaptative et innée, la durée de vie et la mort cellulaire (Deretic et al., 2013; Mizushima and Komatsu, 2011). Aujourd'hui ce processus a été largement décrit dans son implication dans différentes pathologies, et étudié en tant que cible thérapeutique.

Bien que l'autophagie soit un mécanisme non sélectif en général, il peut être aussi un processus hautement sélectif qui cible des structures cellulaires ou des micro-organismes envahissant le cytoplasme. Le processus sélectif autophagique se fait par la reconnaissance du cargo par les récepteurs autophagiques (p62/SQSTM1, NBR1, NDP52, optineurin and BNIP3L), qui connectent les cargos à la machinerie autophagique.

IV.1 Autophagie

Lors de son activation l'ensemble du mécanisme autophagique va permettre la formation de l'autophagosome. Quinze protéines liées à l'autophagie (ATG) sont reconnues comme étant au cœur du mécanisme permettant la formation de l'autophagosome (Mizushima et al., 2011) (Figure 39). Dans les cellules de mammifères, ces protéines Atg sont recrutées pour former le phagophore, qui par élongation forme l'autophagosome. De récentes études montrent que l'élongation de phagophore se fait au niveau du réticulum endoplasmique dans une structure appelée omegasome qui se caractérise par la présence de phosphatidylinositol 3-phosphate liée à la protéine DFCP1 (Axe et al., 2008; Lamb et al., 2013; Shibutani and Yoshimori, 2014). D'autres sources membranaires contribuent à la biogenèse de l'autophagosome, comme

l'appareil de Golgi, les endosomes, le site de contact entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries, les éléments de transitions du réticulum endoplasmique et la membrane plasmique (Lamb et al., 2013; Mizushima et al., 2011). Depuis l'initiation de la formation de l'autophagosome, chaque étape, de l'élongation du phagophore à la fermeture, implique différentes protéines ATG. L'initiation de la formation de l'autophagosome est activée grâce au complexe ULK1, (un orthologue de mammifère d'Atg1 chez la levure) et le complexe 1 phosphatidylinositol 3 kinase (PIK3) qui contient la PIK3C3/VPS34 et son adaptateur VPS15, ATG14L et la Beclin 1 (Figure 39). Ces complexes sont contrôlés par une variété de voies de signalisations sensibles au niveau de nutriments comme le niveau d'ATP, les facteurs de croissance et les espèces réactives à l'oxygène (Lamb et al., 2013). Le phosphatidylinositol 3-phosphate, qui est produit par l'activité enzymatique de la PIK3 de classe III (PIK3C3/VPS34) recrute WIPI1/2, un homologue d'Atg18 chez la levure, au niveau du phagophore. Une des fonctions de WIPI2 est de contrôler le transport d'ATG9 entre le phagophore et la périphérie du Golgi (Orsi et al., 2012). L'adressage d'ATG9 au phagophore est un événement très précoce qui

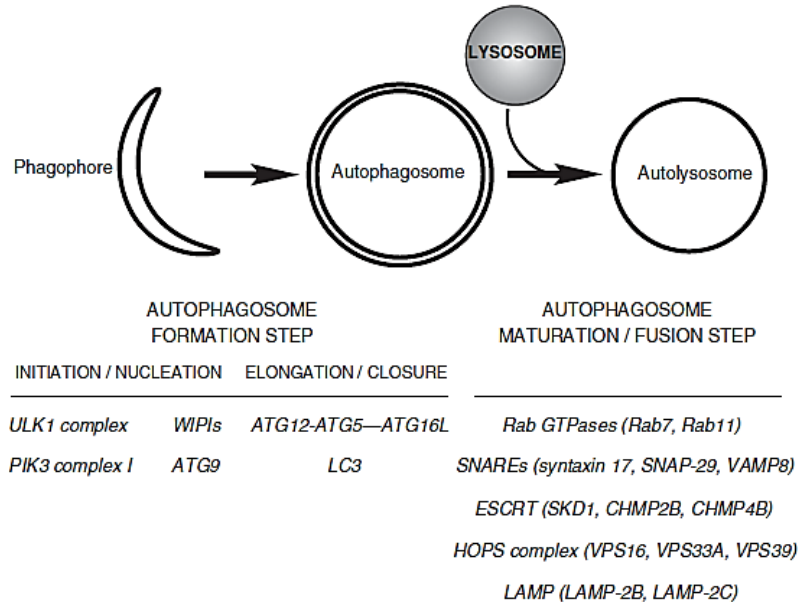


Figure 39 : La voie autophagique. Il y a deux étapes importantes au cours de la voie autophagique : (i) la formation de l'autophagosome, dans laquelle on retrouve les phases d'initiation/nucléation (formation du phagophore) et d'élongation/fermeture, et (ii) la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. Les protéines Atg sont impliquées dans la formation de l'autophagosome ainsi qu'une liste non exhaustive de familles de protéines impliquées dans les étapes de maturation/fusion sont présentées en italique. *Illustration d'après (Orhon et al., 2015).*

se produit juste après l'induction de l'autophagie (Lamb et al., 2013; Zavodszky et al., 2013). WIPI2 permet également de recruter ATG16L qui contribue à l'élongation du phagophore (Dooley et al., 2014). La dernière étape de formation du phagophore fait intervenir le complexe ATG12-ATG5 qui conjugué, interagit avec ATG16L, et la protéine LC3 (liée à la *phosphatidyléthanolamine*) qui sont impliquées dans l'élongation finale et la fermeture de la membrane de l'autophagosome (Figure 39). Une fois formés, les autophagosomes vont fusionner avec des lysosomes à l'aide des GTPases Rab7 et Rab11, des protéines SNAREs et ESCRT (Bento et al., 2013; Tooze et al., 2014) du complexe HOPS (Jiang et al., 2014; Takats et al., 2014) et de certaines protéines de la membrane lysosomale comme LAMP-2 (Saftig et al., 2008). L'étape finale de l'autophagie est la dégradation et le recyclage des composants de la lumière lysosomale (Yu et al., 2010b).

IV.2 HDAC6 et Autophagie

HDAC6 peut se fixer à l'ubiquitine via son domaine BUZ, ce qui contribue au processus autophagique. De plus, HDAC6 contribue aux recrutements des protéines spécifiques du processus autophagique au niveau des agrégats de protéines mal repliées (Bjorkoy et al., 2005; Seibenhener et al., 2004), et à la dynamique des lysosomes (Iwata et al., 2005). Il apparaît également que l'activité déacétylase d'HDAC6 semble nécessaire pour la formation de l'aggresome et sa dégradation autophagique, qui sont influencées par la dynamique des microtubules.

Dans les cellules épithéliales de poumons, l'exposition aux fumées de cigarettes induit une résorption des cils de l'épithélium via un processus autophagique dépendant d'HDAC6. Au cours de ce processus, HDAC6 est responsable de l'apport des protéines des cils vers la machinerie autophagique, et est également impliquée dans la formation de l'autophagosome (Lam et al., 2013) (Figure 40).

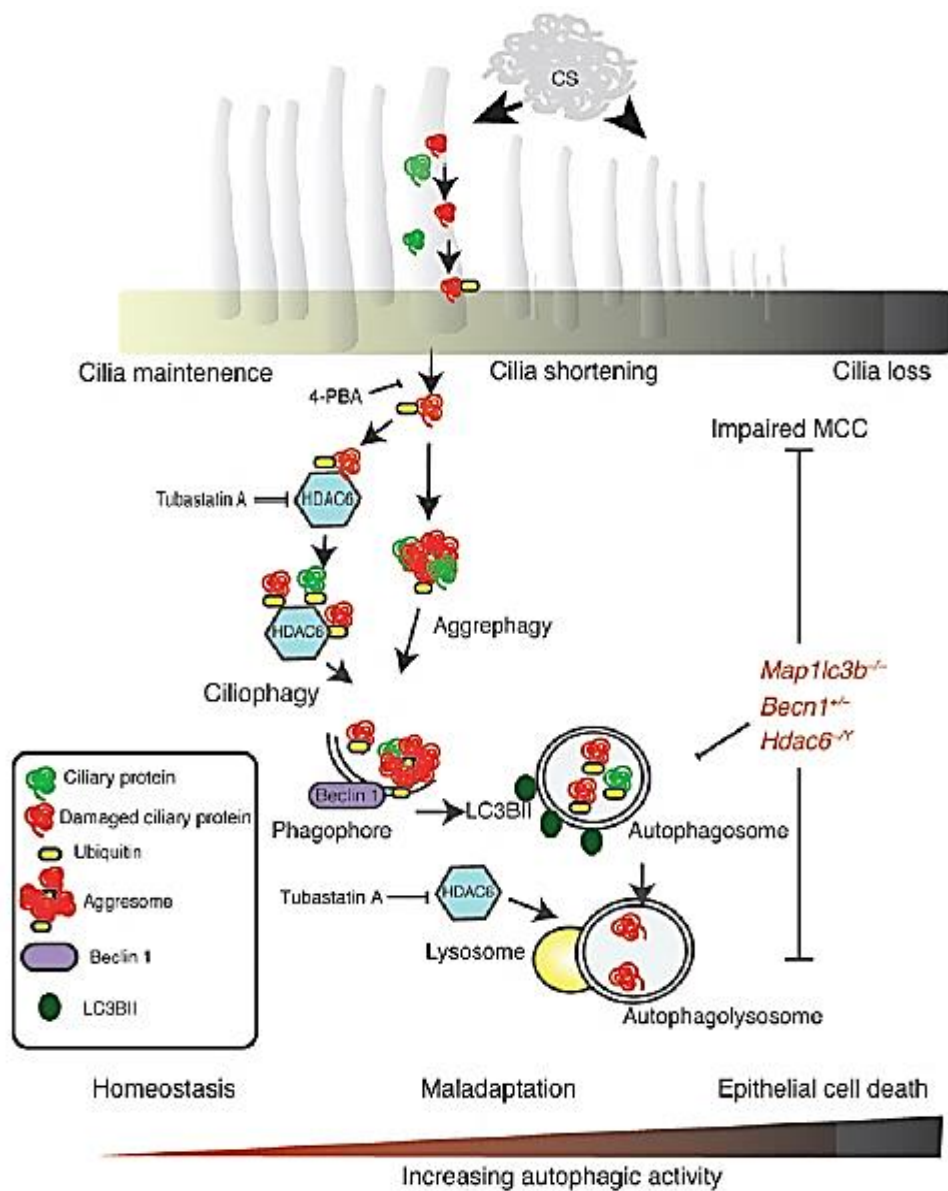


Figure 40 : Schéma de la ciliophagie au niveau de l'épithélium respiratoire lors de l'exposition à la fumée de cigarette. Le fumée de cigarette induit un stress oxydatif qui déstabilise les protéines du cil, engendre des problème de repliement, une ubiquitination et la formation d'un agrégat de protéines. HDAC6 reconnait les protéines ubiquitinées et les délivre à l'autophagosome dont la Beclin 1 et LC3BII sont impliqués dans sa formation. Les protéines sont alors adressées au lysosome pour leur dégradation et leur recyclage. En cas de stress oxydatif chronique, les protéines ciliaires sont dégradées engendrant un raccourcissement des cils de l'épithélium d'après (Hilaire et al., 2013).

IV.3 Résultats obtenus

IV.3.1 Régulation de l'autophagie par la dexaméthasone et la tubacine

Les liens entre le cil primaire, la différenciation adipocytaire et HDAC6 semblent donc être importants. Nous avons alors voulu vérifier la régulation de l'autophagie en analysant le niveau de LC3-II après 12 heures soit en présence du cocktail de différenciation adipocytaire complet soit en présence de dexaméthasone soit en présence de dexaméthasone et de tubacine. Les résultats de western blot montrent qu'en condition de déplétion, l'autophagie augmente (Figure 41). En présence de dexaméthasone ou de 5 μ M de tubacine et de dexaméthasone, le ratio LC3-II/LC3-I est plus important que dans les cellules déplétées (Figure 41). En présence de bafilomycine, un inhibiteur de l'autophagie, on observe une forte accumulation de LC3-II indiquant une forte accumulation des autophagosomes qui ne sont pas dégradés (Figure 41). En revanche, en présence du mix de différenciation, on n'observe pas de différences significatives avec les cellules en prolifération.

IV.3.2 Autophagie et cil primaire

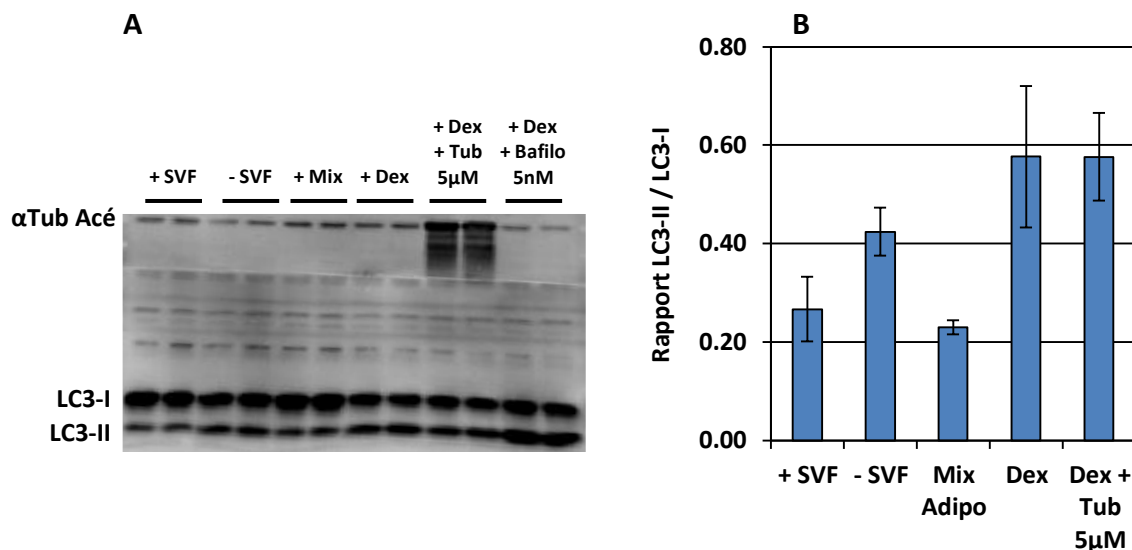


Figure 41 : Régulation de l'autophagie en présence du cocktail de différenciation, de dexaméthasone et de tubacine. (A) Western blot sur les cellules hMADS indiquant les niveaux de LC3-I et LC3-II (marqueur de l'activation de l'autophagie), après 12 heures de traitement en présence de SVF, en absence de SVF, avec le cocktail adipogénique (Mix), en présence de dexaméthasone à 1 μ M seule, avec 5 μ M tubacine, avec 5nM Bafilomycine. **(B)** Quantification du rapport LC3-II/LC3-I dans les différentes conditions, n=2.

Dans les cellules en milieu de déplétion, on peut voir que la taille moyenne du cil varie entre 2 et 4 μm de long. Dans le milieu de différenciation adipocytaire, la taille du cil est plus importante, avec une taille moyenne comprise entre 4 et 6 μm et la présence de cils supérieurs à cette taille, ce qui est conforme avec les données que nous avons observées précédemment (Figure 42). En présence de dexaméthasone, la distribution des tailles des cils est comparable à ce que l'on observe dans les cellules en milieu de différenciation. Un traitement de 5 μM de tubacine et de dexaméthasone pendant trois jours conduit à une perte de l'élongation du cil induit par la dexaméthasone (Figure 42). Enfin, l'ajout de 5nM de bafilomycine dans les cellules en présence de dexaméthasone pendant trois jours induit une inhibition de l'élongation du cil plus importante que l'effet engendré par la tubacine seul (Figure 42).

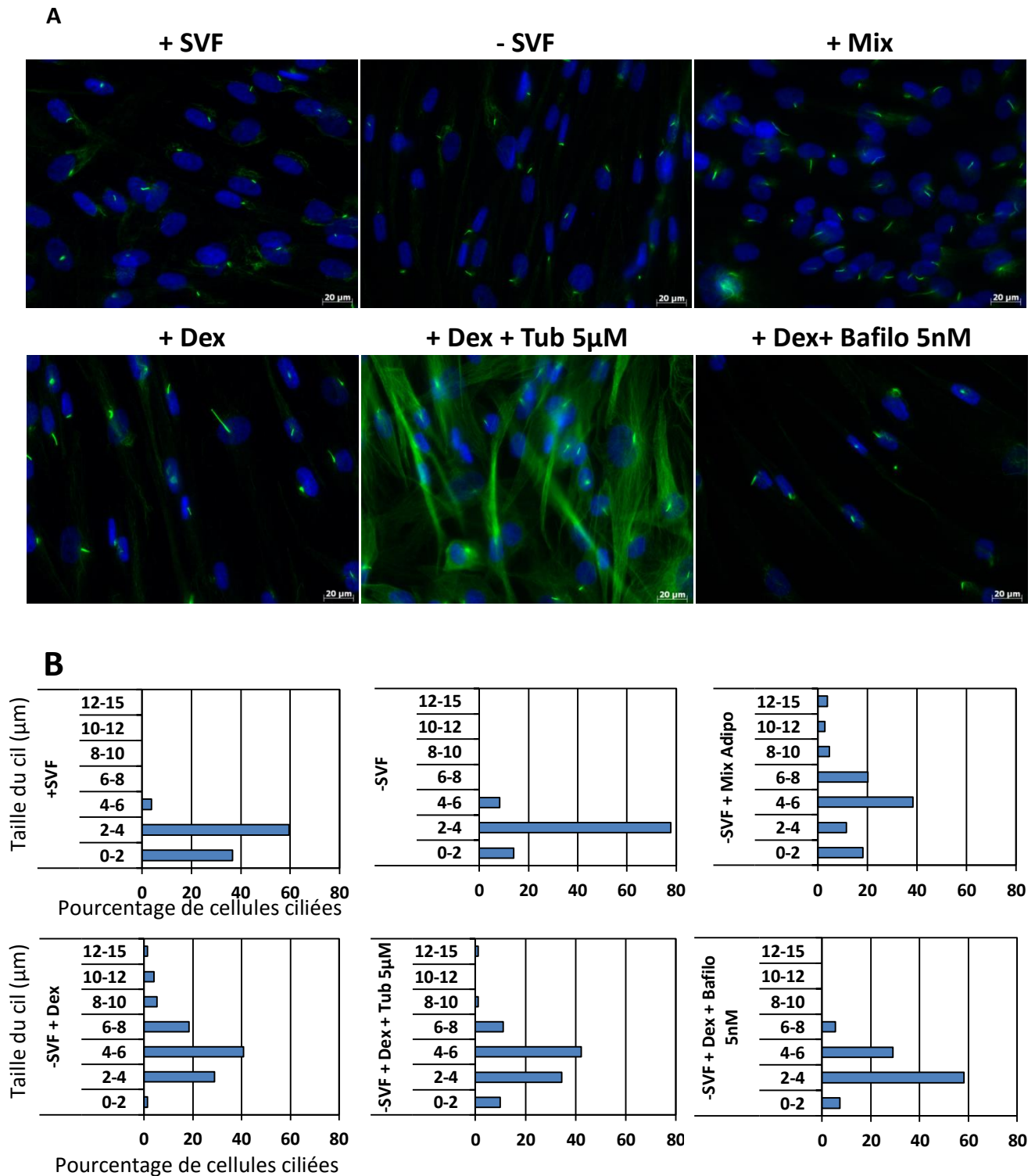


Figure 42 : Effet de l'autophagie dans la régulation de la taille du cil. (A) Immunocytochimie de cellules hMADS traitées pendant 3 jours en présence ou en absence de SVF, en présence du cocktail de différenciation, de dexaméthasone seulement, de dexaméthasone avec 5μM de tubacine ou de dexaméthasone avec 5nM de bafilomycine. (B) Quantification de la taille du cil des cellules ciliées traitées pendant 3 jours avec les mêmes conditions.

IV.4 Discussion des résultats sur l'implication du processus autophagique dans l'élongation du cil primaire

Les données que nous avons obtenues montrent que les cellules traitées avec de la dexaméthasone présentent un niveau de LC3-II plus élevé que dans les cellules déplétées, et que l'inhibition de l'autophagie engendre une perte de l'élongation du cil primaire induite par la dexaméthasone. De ce fait, l'élongation du cil pourrait être provoquée par l'activation de l'autophagie sous le contrôle de la voie des glucocorticoïdes pendant les étapes précoces de la différenciation adipocytaire.

Dans les parties précédentes de ce manuscrit, nous avons déjà évoqué les effets de l'autophagie sur la régulation de la taille du cil. En effet il a été observé que l'autophagie était responsable de la dégradation d'Ofd1 ce qui engendre une élongation du cil (Tang et al., 2013). De plus, si les observations que nous avons faites s'avèrent correctes, on peut apporter une interprétation alternative à certaines données que nous avons recueillies.

Comme nous l'avons vu, HDAC6 est impliquée à différents niveaux au cours du processus autophagique. Or les rapports LC3-II/LC3-I en présence de 5 μ M de tubacine ou en présence de dexaméthasone sont comparables. Néanmoins, l'étude de ce ratio n'est pas représentative du niveau d'autophagie, mais seulement de l'accumulation des autophagosomes. D'après la littérature, HDAC6 est impliqué dans la fusion de l'autophagosome avec le lysosome par désacétylation de la cortactine qui recrute des filaments d'actines pour faire le lien entre ces deux vésicules (Lee and Yao, 2010). De ce fait, le rapport LC3-II/LC3-I observé lors de l'inhibition d'HDAC6 par la tubacine doit être interprété dans le même sens que le rapport engendré par le traitement à la bafilomycine, qui un inhibiteur spécifique des pompes à proton-ATPases des vacuoles lysosomiales, empêchant l'acidification et donc l'activation des enzymes lysosomiales catabolisantes. L'inhibition d'HDAC6 engendrerait ainsi une inhibition de l'autophagie, ce qui empêcherait la dégradation de certaines protéines ciliaires, comme Ofd1, conduisant à un blocage de l'élongation du cil primaire.

Nous n'avons malheureusement pas analysé la régulation de l'autophagie dans les lignées gain de fonction pour HDAC6. Toutefois, nous avons pu observer une diminution du niveau de tubuline acétylée dans ces cellules. Le niveau d'acétylation de la tubuline a notamment été étudié dans les pathologies neurodégénératives comme la pathologie de Huntington caractérisée par une perte du recrutement des moteurs moléculaires (kinésine et dynéine) (Iwata et al., 2005). Il a été observé dans les cellules de souris modèles pour cette pathologie que l'inhibition d'HDAC6 conduit à une augmentation de l'acétylation de la tubuline, ce qui permet de restaurer le transport cellulaire. Ainsi on peut émettre l'hypothèse que la perturbation du niveau d'acétylation de la tubuline dans les hMADS surexprimant HDAC6, conduirait à une diminution du trafic cellulaire. Cela aurait pour conséquence de perturber différents mécanismes comme le réarrangement du cytoplasme ou le transport des vésicules allant de l'appareil de Golgi vers le cil. Mais aussi de perturber la formation des agrégats de protéines mal repliées qui est un processus dépendant du transport rétrograde médié par les dynéines, ce qui perturberait le processus autophagique.

Références

Références

- Aarsland, A., Chinkes, D., and Wolfe, R.R. (1997). Hepatic and whole-body fat synthesis in humans during carbohydrate overfeeding. *Am J Clin Nutr* 65, 1774-1782.
- Abdul-Majeed, S., Moloney, B.C., and Nauli, S.M. (2012). Mechanisms regulating cilia growth and cilia function in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 69, 165-173.
- Acheson, K.J., Schutz, Y., Bessard, T., Anantharaman, K., Flatt, J.P., and Jequier, E. (1988). Glycogen storage capacity and de novo lipogenesis during massive carbohydrate overfeeding in man. *Am J Clin Nutr* 48, 240-247.
- Agarwal, A.K., Arioglu, E., De Almeida, S., Akkoc, N., Taylor, S.I., Bowcock, A.M., Barnes, R.I., and Garg, A. (2002). AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34. *Nat Genet* 31, 21-23.
- Aikin, R.A., Ayers, K.L., and Therond, P.P. (2008). The role of kinases in the Hedgehog signalling pathway. *EMBO Rep* 9, 330-336.
- Akella, J.S., Wloga, D., Kim, J., Starostina, N.G., Lyons-Abbott, S., Morrisette, N.S., Dougan, S.T., Kipreos, E.T., and Gaertig, J. (2010). MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature* 467, 218-222.
- Albrecht-Buehler, G. (1977). Phagokinetic tracks of 3T3 cells: parallels between the orientation of track segments and of cellular structures which contain actin or tubulin. *Cell* 12, 333-339.
- Aldana-Masangkay, G.I., and Sakamoto, K.M. (2011). The role of HDAC6 in cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011, 875824.
- Alonso-Castro, A.J., Zapata-Bustos, R., Gomez-Espinoza, G., and Salazar-Olivo, L.A. (2012). Isoorientin reverts TNF-alpha-induced insulin resistance in adipocytes activating the insulin signaling pathway. *Endocrinology* 153, 5222-5230.
- Ansley, S.J., Badano, J.L., Blacque, O.E., Hill, J., Hoskins, B.E., Leitch, C.C., Kim, J.C., Ross, A.J., Eichers, E.R., Teslovich, T.M., *et al.* (2003). Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 425, 628-633.
- Antuna-Puente, B., Feve, B., Fellahi, S., and Bastard, J.P. (2008). Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 34, 2-11.
- Arnaldi, G., Mancini, T., Polenta, B., and Boscaro, M. (2004). Cardiovascular risk in Cushing's syndrome. *Pituitary* 7, 253-256.
- Arner, P., Bernard, S., Salehpour, M., Possnert, G., Liebl, J., Steier, P., Buchholz, B.A., Eriksson, M., Arner, E., Hauner, H., *et al.* (2011). Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease. *Nature* 478, 110-113.
- Aron-Wisnewsky, J., Tordjman, J., Poitou, C., Darakhshan, F., Hugol, D., Basdevant, A., Aissat, A., Guerre-Millo, M., and Clement, K. (2009). Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 4619-4623.
- Arts, H.H., Bongers, E.M., Mans, D.A., van Beersum, S.E., Oud, M.M., Bolat, E., Spruijt, L., Cornelissen, E.A., Schuurs-Hoeijmakers, J.H., de Leeuw, N., *et al.* (2011). C14ORF179 encoding IFT43 is mutated in Sensenbrenner syndrome. *J Med Genet* 48, 390-395.
- Aubusson-Fleury, A., Lemullois, M., de Loubresse, N.G., Laligne, C., Cohen, J., Rosnet, O., Jerka-Dziadosz, M., Beisson, J., and Koll, F. (2012). The conserved centrosomal protein FOR20 is required for assembly of the transition zone and basal body docking at the cell surface. *J Cell Sci* 125, 4395-4404.
- Avidor-Reiss, T., Maer, A.M., Koundakjian, E., Polyanovsky, A., Keil, T., Subramaniam, S., and Zuker, C.S. (2004). Decoding cilia function: defining specialized genes required for compartmentalized cilia biogenesis. *Cell* 117, 527-539.

- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 182, 685-701.
- Bacaj, T., Lu, Y., and Shaham, S. (2008). The conserved proteins CHE-12 and DYF-11 are required for sensory cilium function in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 178, 989-1002.
- Baldari, C.T., and Rosenbaum, J. (2010). Intraflagellar transport: it's not just for cilia anymore. *Curr Opin Cell Biol* 22, 75-80.
- Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., Rocha, K., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Atadja, P., *et al.* (2005). Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 280, 26729-26734.
- Ballard, F.J., Hanson, R.W., and Leveille, G.A. (1967). Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. *J Biol Chem* 242, 2746-2750.
- Baly, C., Aioun, J., Badonnel, K., Lacroix, M.C., Durieux, D., Schlegel, C., Salesse, R., and Caillol, M. (2007). Leptin and its receptors are present in the rat olfactory mucosa and modulated by the nutritional status. *Brain Res* 1129, 130-141.
- Bamshad, M., Aoki, V.T., Adkison, M.G., Warren, W.S., and Bartness, T.J. (1998). Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am J Physiol* 275, R291-299.
- Banerjee, S.S., Feinberg, M.W., Watanabe, M., Gray, S., Haspel, R.L., Denking, D.J., Kawahara, R., Hauner, H., and Jain, M.K. (2003). The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J Biol Chem* 278, 2581-2584.
- Bastard, J.P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M.J., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J., and Feve, B. (2006). Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 17, 4-12.
- Beech, P.L., Pagh-Roehl, K., Noda, Y., Hirokawa, N., Burnside, B., and Rosenbaum, J.L. (1996). Localization of kinesin superfamily proteins to the connecting cilium of fish photoreceptors. *J Cell Sci* 109 (Pt 4), 889-897.
- Bennett, C.N., Longo, K.A., Wright, W.S., Suva, L.J., Lane, T.F., Hankenson, K.D., and MacDougald, O.A. (2005). Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3324-3329.
- Bento, C.F., Puri, C., Moreau, K., and Rubinsztein, D.C. (2013). The role of membrane-trafficking small GTPases in the regulation of autophagy. *J Cell Sci* 126, 1059-1069.
- Berbari, N.F., Lewis, J.S., Bishop, G.A., Askwith, C.C., and Mykityn, K. (2008). Bardet-Biedl syndrome proteins are required for the localization of G protein-coupled receptors to primary cilia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4242-4246.
- Berbari, N.F., Pasek, R.C., Malarkey, E.B., Yazdi, S.M., McNair, A.D., Lewis, W.R., Nagy, T.R., Kesterson, R.A., and Yoder, B.K. (2013). Leptin resistance is a secondary consequence of the obesity in ciliopathy mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7796-7801.
- Bergmann, C., Fliegauf, M., Bruchle, N.O., Frank, V., Olbrich, H., Kirschner, J., Schermer, B., Schmedding, I., Kispert, A., Kranzlin, B., *et al.* (2008). Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia. *Am J Hum Genet* 82, 959-970.
- Berry, R., and Rodeheffer, M.S. (2013). Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat Cell Biol* 15, 302-308.

- Bershteyn, M., Atwood, S.X., Woo, W.M., Li, M., and Oro, A.E. (2010). MIM and cortactin antagonism regulates ciliogenesis and hedgehog signaling. *Dev Cell* 19, 270-283.
- Bertos, N.R., Gilquin, B., Chan, G.K., Yen, T.J., Khochbin, S., and Yang, X.J. (2004). Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *J Biol Chem* 279, 48246-48254.
- Besschetnova, T.Y., Kolpakova-Hart, E., Guan, Y., Zhou, J., Olsen, B.R., and Shah, J.V. (2010). Identification of signaling pathways regulating primary cilium length and flow-mediated adaptation. *Curr Biol* 20, 182-187.
- Bezaire, V., and Langin, D. (2009). Regulation of adipose tissue lipolysis revisited. *Proc Nutr Soc* 68, 350-360.
- Bezy, O., Elabd, C., Cochet, O., Petersen, R.K., Kristiansen, K., Dani, C., Ailhaud, G., and Amri, E.Z. (2005). Delta-interacting protein A, a new inhibitory partner of CCAAT/enhancer-binding protein beta, implicated in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 280, 11432-11438.
- Bielas, S.L., Silhavy, J.L., Brancati, F., Kisseleva, M.V., Al-Gazali, L., Sztriha, L., Bayoumi, R.A., Zaki, M.S., Abdel-Aleem, A., Rosti, R.O., *et al.* (2009). Mutations in INPP5E, encoding inositol polyphosphate-5-phosphatase E, link phosphatidyl inositol signaling to the ciliopathies. *Nat Genet* 41, 1032-1036.
- Billon, N., Iannarelli, P., Monteiro, M.C., Glavieux-Pardanaud, C., Richardson, W.D., Kessaris, N., Dani, C., and Dupin, E. (2007). The generation of adipocytes by the neural crest. *Development* 134, 2283-2292.
- Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., *et al.* (1998). A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 17, 3052-3065.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., and Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171, 603-614.
- Blacque, O.E., Li, C., Inglis, P.N., Esmail, M.A., Ou, G., Mah, A.K., Baillie, D.L., Scholey, J.M., and Leroux, M.R. (2006). The WD repeat-containing protein IFTA-1 is required for retrograde intraflagellar transport. *Mol Biol Cell* 17, 5053-5062.
- Blacque, O.E., Reardon, M.J., Li, C., McCarthy, J., Mahjoub, M.R., Ansley, S.J., Badano, J.L., Mah, A.K., Beales, P.L., Davidson, W.S., *et al.* (2004). Loss of *C. elegans* BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport. *Genes Dev* 18, 1630-1642.
- Blaineau, C., Tessier, M., Dubessay, P., Tasse, L., Crobu, L., Pages, M., and Bastien, P. (2007). A novel microtubule-depolymerizing kinesin involved in length control of a eukaryotic flagellum. *Curr Biol* 17, 778-782.
- Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Barber, T., Coxey, R.A., Takeda, T., Rondinone, C.M., Theodorakis, J.L., Greenberg, A.S., and Londos, C. (1995). Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res* 36, 1211-1226.
- Bloodgood, R.A. (1984). Preferential turnover of membrane proteins in the intact *Chlamydomonas* flagellum. *Exp Cell Res* 150, 488-493.
- Bloodgood, R.A. (1995). Flagellar surface motility: gliding and microsphere movements. *Methods Cell Biol* 47, 273-279.
- Bostrom, H., Willetts, K., Pekny, M., Leveen, P., Lindahl, P., Hedstrand, H., Pekna, M., Hellstrom, M., Gebre-Medhin, S., Schalling, M., *et al.* (1996). PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell* 85, 863-873.
- Boudjelal, M., Taneja, R., Matsubara, S., Bouillet, P., Dolle, P., and Chambon, P. (1997). Overexpression of Stra13, a novel retinoic acid-inducible gene of the basic helix-loop-helix

- family, inhibits mesodermal and promotes neuronal differentiation of P19 cells. *Genes Dev* 11, 2052-2065.
- Boyault, C., Gilquin, B., Zhang, Y., Rybin, V., Garman, E., Meyer-Klaucke, W., Matthias, P., Muller, C.W., and Khochbin, S. (2006). HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover. *EMBO J* 25, 3357-3366.
 - Boyault, C., Zhang, Y., Fritah, S., Caron, C., Gilquin, B., Kwon, S.H., Garrido, C., Yao, T.P., Vourc'h, C., Matthias, P., *et al.* (2007). HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes Dev* 21, 2172-2181.
 - Bradley, B.A., and Quarmby, L.M. (2005). A NIMA-related kinase, Cnk2p, regulates both flagellar length and cell size in *Chlamydomonas*. *J Cell Sci* 118, 3317-3326.
 - Brito, J.M., Teillet, M.A., and Le Douarin, N.M. (2006). An early role for sonic hedgehog from foregut endoderm in jaw development: ensuring neural crest cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11607-11612.
 - Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., and Hokfelt, T. (1998). The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15043-15048.
 - Broekhuis, J.R., Leong, W.Y., and Jansen, G. (2013). Regulation of cilium length and intraflagellar transport. *Int Rev Cell Mol Biol* 303, 101-138.
 - Bui, K.H., Yagi, T., Yamamoto, R., Kamiya, R., and Ishikawa, T. (2012). Polarity and asymmetry in the arrangement of dynein and related structures in the *Chlamydomonas* axoneme. *J Cell Biol* 198, 913-925.
 - Buttitta, L., Mo, R., Hui, C.C., and Fan, C.M. (2003). Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction. *Development* 130, 6233-6243.
 - Cabrero, J.R., Serrador, J.M., Barreiro, O., Mittelbrunn, M., Naranjo-Suarez, S., Martin-Cofreces, N., Vicente-Manzanares, M., Mazitschek, R., Bradner, J.E., Avila, J., *et al.* (2006). Lymphocyte chemotaxis is regulated by histone deacetylase 6, independently of its deacetylase activity. *Mol Biol Cell* 17, 3435-3445.
 - Campbell, J.E., Peckett, A.J., D'Souza A, M., Hawke, T.J., and Riddell, M.C. (2011). Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. *Am J Physiol Cell Physiol* 300, C198-209.
 - Cano, D.A., Murcia, N.S., Pazour, G.J., and Hebrok, M. (2004). Orpk mouse model of polycystic kidney disease reveals essential role of primary cilia in pancreatic tissue organization. *Development* 131, 3457-3467.
 - Cano, D.A., Sekine, S., and Hebrok, M. (2006). Primary cilia deletion in pancreatic epithelial cells results in cyst formation and pancreatitis. *Gastroenterology* 131, 1856-1869.
 - Cao, Z., Umek, R.M., and McKnight, S.L. (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5, 1538-1552.
 - Cawthorn, W.P., Scheller, E.L., and MacDougald, O.A. (2012). Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res* 53, 227-246.
 - Chang, B., Khanna, H., Hawes, N., Jimeno, D., He, S., Lillo, C., Parapuram, S.K., Cheng, H., Scott, A., Hurd, R.E., *et al.* (2006). In-frame deletion in a novel centrosomal/ciliary protein CEP290/NPHP6 perturbs its interaction with RPGR and results in early-onset retinal degeneration in the rd16 mouse. *Hum Mol Genet* 15, 1847-1857.
 - Chen, M.H., Wilson, C.W., Li, Y.J., Law, K.K., Lu, C.S., Gacayan, R., Zhang, X., Hui, C.C., and Chuang, P.T. (2009). Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes Dev* 23, 1910-1928.
 - Chen, Z., Torrens, J.I., Anand, A., Spiegelman, B.M., and Friedman, J.M. (2005). Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBPbeta-dependent and -independent mechanisms. *Cell Metab* 1, 93-106.

- Chen, Z.X., and Wang, G.W. (2005). One-pot sequential synthesis of acetoxylated [60]fullerene derivatives. *J Org Chem* 70, 2380-2383.
- Cheung, H.O., Zhang, X., Ribeiro, A., Mo, R., Makino, S., Puviindran, V., Law, K.K., Briscoe, J., and Hui, C.C. (2009). The kinesin protein Kif7 is a critical regulator of Gli transcription factors in mammalian hedgehog signaling. *Sci Signal* 2, ra29.
- Chiang, A.P., Beck, J.S., Yen, H.J., Tayeh, M.K., Scheetz, T.E., Swiderski, R.E., Nishimura, D.Y., Braun, T.A., Kim, K.Y., Huang, J., *et al.* (2006). Homozygosity mapping with SNP arrays identifies TRIM32, an E3 ubiquitin ligase, as a Bardet-Biedl syndrome gene (BBS11). *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6287-6292.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., and Beachy, P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-413.
- Chih, B., Liu, P., Chinn, Y., Chalouni, C., Komuves, L.G., Hass, P.E., Sandoval, W., and Peterson, A.S. (2012). A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. *Nat Cell Biol* 14, 61-72.
- Chirala, S.S., and Wakil, S.J. (2004). Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids* 39, 1045-1053.
- Chiu, Y.C., Shieh, D.C., Tong, K.M., Chen, C.P., Huang, K.C., Chen, P.C., Fong, Y.C., Hsu, H.C., and Tang, C.H. (2009). Involvement of AdipoR receptor in adiponectin-induced motility and alpha2beta1 integrin upregulation in human chondrosarcoma cells. *Carcinogenesis* 30, 1651-1659.
- Cho, Y.W., Hong, S., Jin, Q., Wang, L., Lee, J.E., Gavrilova, O., and Ge, K. (2009). Histone methylation regulator PTIP is required for PPARgamma and C/EBPalpha expression and adipogenesis. *Cell Metab* 10, 27-39.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., and Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325, 834-840.
- Christy, R.J., Kaestner, K.H., Geiman, D.E., and Lane, M.D. (1991). CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2593-2597.
- Cinti, S., Cigolini, M., Bosello, O., and Bjorntorp, P. (1984). A morphological study of the adipocyte precursor. *J Submicrosc Cytol* 16, 243-251.
- Clarke, S.L., Robinson, C.E., and Gimble, J.M. (1997). CAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 240, 99-103.
- Clement, A., Solnica-Krezel, L., and Gould, K.L. (2011). The Cdc14B phosphatase contributes to ciliogenesis in zebrafish. *Development* 138, 291-302.
- Coburn, C.T., Knapp, F.F., Jr., Febbraio, M., Beets, A.L., Silverstein, R.L., and Abumrad, N.A. (2000). Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem* 275, 32523-32529.
- Coe, N.R., Simpson, M.A., and Bernlohr, D.A. (1999). Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res* 40, 967-972.
- Cole, D.G. (2003). The intraflagellar transport machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Traffic* 4, 435-442.
- Cole, D.G., Cande, W.Z., Baskin, R.J., Skoufias, D.A., Hogan, C.J., and Scholey, J.M. (1992). Isolation of a sea urchin egg kinesin-related protein using peptide antibodies. *J Cell Sci* 101 (Pt 2), 291-301.

- Cole, D.G., Chinn, S.W., Wedaman, K.P., Hall, K., Vuong, T., and Scholey, J.M. (1993). Novel heterotrimeric kinesin-related protein purified from sea urchin eggs. *Nature* **366**, 268-270.
- Cole, D.G., Diener, D.R., Himelblau, A.L., Beech, P.L., Fuster, J.C., and Rosenbaum, J.L. (1998). Chlamydomonas kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. *J Cell Biol* **141**, 993-1008.
- Cole, D.G., and Snell, W.J. (2009). SnapShot: Intraflagellar transport. *Cell* **137**, 784-784 e781.
- Collombat, P., Xu, X., Heimberg, H., and Mansouri, A. (2010). Pancreatic beta-cells: from generation to regeneration. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 838-844.
- Conacci-Sorrell, M., Ngouenet, C., and Eisenman, R.N. (2010). Myc-nick: a cytoplasmic cleavage product of Myc that promotes alpha-tubulin acetylation and cell differentiation. *Cell* **142**, 480-493.
- Corbit, K.C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A.R., Stainier, D.Y., and Reiter, J.F. (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* **437**, 1018-1021.
- Corbit, K.C., Shyer, A.E., Dowdle, W.E., Gaulden, J., Singla, V., Chen, M.H., Chuang, P.T., and Reiter, J.F. (2008). Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms. *Nat Cell Biol* **10**, 70-76.
- Cortellino, S., Wang, C., Wang, B., Bassi, M.R., Caretti, E., Champeval, D., Calmont, A., Jarnik, M., Burch, J., Zaret, K.S., *et al.* (2009). Defective ciliogenesis, embryonic lethality and severe impairment of the Sonic Hedgehog pathway caused by inactivation of the mouse complex A intraflagellar transport gene *Ift122/Wdr10*, partially overlapping with the DNA repair gene *Med1/Mbd4*. *Dev Biol* **325**, 225-237.
- Creppe, C., Malinouskaya, L., Volvert, M.L., Gillard, M., Close, P., Malaise, O., Laguesse, S., Cornez, I., Rahmouni, S., Ormenese, S., *et al.* (2009). Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell* **136**, 551-564.
- Cust, A.E., Kaaks, R., Friedenreich, C., Bonnet, F., Laville, M., Lukanova, A., Rinaldi, S., Dossus, L., Slimani, N., Lundin, E., *et al.* (2007). Plasma adiponectin levels and endometrial cancer risk in pre- and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 255-263.
- Dahl, H.A. (1963). Fine structure of cilia in rat cerebral cortex. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **60**, 369-386.
- Dal Maso, L., Augustin, L.S., Karalis, A., Talamini, R., Franceschi, S., Trichopoulos, D., Mantzoros, C.S., and La Vecchia, C. (2004). Circulating adiponectin and endometrial cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 1160-1163.
- Dani, C. (2013). Activins in adipogenesis and obesity. *Int J Obes (Lond)* **37**, 163-166.
- Davenport, J.R., Watts, A.J., Roper, V.C., Croyle, M.J., van Groen, T., Wyss, J.M., Nagy, T.R., Kesterson, R.A., and Yoder, B.K. (2007). Disruption of intraflagellar transport in adult mice leads to obesity and slow-onset cystic kidney disease. *Curr Biol* **17**, 1586-1594.
- Davey, M.G., James, J., Paton, I.R., Burt, D.W., and Tickle, C. (2007). Analysis of *talpid3* and wild-type chicken embryos reveals roles for Hedgehog signalling in development of the limb bud vasculature. *Dev Biol* **301**, 155-165.
- Davis, R.E., Swiderski, R.E., Rahmouni, K., Nishimura, D.Y., Mullins, R.F., Agassandian, K., Philp, A.R., Searby, C.C., Andrews, M.P., Thompson, S., *et al.* (2007). A knockin mouse model of the Bardet-Biedl syndrome 1 M390R mutation has cilia defects, ventriculomegaly, retinopathy, and obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19422-19427.
- Dawe, H.R., Smith, U.M., Cullinane, A.R., Gerrelli, D., Cox, P., Badano, J.L., Blair-Reid, S., Sriram, N., Katsanis, N., Attie-Bitach, T., *et al.* (2007). The Meckel-Gruber Syndrome proteins MKS1 and meckelin interact and are required for primary cilium formation. *Hum Mol Genet* **16**, 173-186.

- Dawson, S.C., Sagolla, M.S., Mancuso, J.J., Woessner, D.J., House, S.A., Fritz-Laylin, L., and Cande, W.Z. (2007). Kinesin-13 regulates flagellar, interphase, and mitotic microtubule dynamics in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot Cell* 6, 2354-2364.
- de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A.B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370, 737-749.
- Delous, M., Baala, L., Salomon, R., Laclef, C., Vierkotten, J., Tory, K., Golzio, C., Lacoste, T., Besse, L., Ozilou, C., *et al.* (2007). The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nat Genet* 39, 875-881.
- Dentler, W. (2005). Intraflagellar transport (IFT) during assembly and disassembly of *Chlamydomonas* flagella. *J Cell Biol* 170, 649-659.
- Denton, R.M., and Brownsey, R.W. (1983). The role of phosphorylation in the regulation of fatty acid synthesis by insulin and other hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 302, 33-45.
- Deretic, V., Saitoh, T., and Akira, S. (2013). Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 722-737.
- Despres, J.P. (1993). Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome. *Nutrition* 9, 452-459.
- Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20, 649-688.
- Diraison, F., Yankah, V., Letexier, D., Dusserre, E., Jones, P., and Beylot, M. (2003). Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans. *J Lipid Res* 44, 846-853.
- Dooley, H.C., Razi, M., Polson, H.E., Girardin, S.E., Wilson, M.I., and Tooze, S.A. (2014). WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol Cell* 55, 238-252.
- Downing, K.H., and Sui, H. (2007). Structural insights into microtubule doublet interactions in axonemes. *Curr Opin Struct Biol* 17, 253-259.
- Ede, D.A., and Kelly, W.A. (1964a). Developmental Abnormalities in the Head Region of the Talpid Mutant of the Fowl. *J Embryol Exp Morphol* 12, 161-182.
- Ede, D.A., and Kelly, W.A. (1964b). Developmental Abnormalities in the Trunk and Limbs of the Talpid3 Mutant of the Fowl. *J Embryol Exp Morphol* 12, 339-356.
- Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (1998). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21, 1375-1385.
- Endoh-Yamagami, S., Evangelista, M., Wilson, D., Wen, X., Theunissen, J.W., Phamluong, K., Davis, M., Scales, S.J., Solloway, M.J., de Sauvage, F.J., *et al.* (2009). The mammalian Cos2 homolog Kif7 plays an essential role in modulating Hh signal transduction during development. *Curr Biol* 19, 1320-1326.
- Engel, B.D., Ludington, W.B., and Marshall, W.F. (2009). Intraflagellar transport particle size scales inversely with flagellar length: revisiting the balance-point length control model. *J Cell Biol* 187, 81-89.
- Ernst, M.B., Wunderlich, C.M., Hess, S., Paehler, M., Mesaros, A., Koralov, S.B., Kleinridders, A., Husch, A., Munzberg, H., Hampel, B., *et al.* (2009). Enhanced Stat3 activation in POMC neurons provokes negative feedback inhibition of leptin and insulin signaling in obesity. *J Neurosci* 29, 11582-11593.
- Fajas, L., Auboeuf, D., Raspe, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, J.C., Deeb, S., *et al.* (1997). The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 272, 18779-18789.

- Farzan, S.F., Ascano, M., Jr., Ogden, S.K., Sanial, M., Brigui, A., Plessis, A., and Robbins, D.J. (2008). Costal2 functions as a kinesin-like protein in the hedgehog signal transduction pathway. *Curr Biol* 18, 1215-1220.
- Feldmann, H.M., Golozoubova, V., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2009). UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* 9, 203-209.
- Ferrante, M.I., Giorgio, G., Feather, S.A., Bulfone, A., Wright, V., Ghiani, M., Selicorni, A., Gammaro, L., Scolari, F., Woolf, A.S., *et al.* (2001). Identification of the gene for oral-facial-digital type I syndrome. *Am J Hum Genet* 68, 569-576.
- Ferrante, M.I., Zullo, A., Barra, A., Bimonte, S., Messaddeq, N., Studer, M., Dolle, P., and Franco, B. (2006). Oral-facial-digital type I protein is required for primary cilia formation and left-right axis specification. *Nat Genet* 38, 112-117.
- Feuillan, P.P., Ng, D., Han, J.C., Sapp, J.C., Wetsch, K., Spaulding, E., Zheng, Y.C., Caruso, R.C., Brooks, B.P., Johnston, J.J., *et al.* (2011). Patients with Bardet-Biedl syndrome have hyperleptinemia suggestive of leptin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 96, E528-535.
- Fischle, W., Kiermer, V., Dequiedt, F., and Verdin, E. (2001). The emerging role of class II histone deacetylases. *Biochem Cell Biol* 79, 337-348.
- Fleming, W. (1871). On the formation and regression of fat cells in connective tissue with comment on the structure of the latter. *Arch R mikr Anat* 7, 15.
- Follit, J.A., Tuft, R.A., Fogarty, K.E., and Pazour, G.J. (2006). The intraflagellar transport protein IFT20 is associated with the Golgi complex and is required for cilia assembly. *Mol Biol Cell* 17, 3781-3792.
- Follit, J.A., Xu, F., Keady, B.T., and Pazour, G.J. (2009). Characterization of mouse IFT complex B. *Cell Motil Cytoskeleton* 66, 457-468.
- Fontaine, C., Cousin, W., Plaisant, M., Dani, C., and Peraldi, P. (2008). Hedgehog signaling alters adipocyte maturation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26, 1037-1046.
- Fonte, V.G., Searls, R.L., and Hilfer, S.R. (1971). The relationship of cilia with cell division and differentiation. *J Cell Biol* 49, 226-229.
- Forsberg-Nilsson, K., Behar, T.N., Afrakhte, M., Barker, J.L., and McKay, R.D. (1998). Platelet-derived growth factor induces chemotaxis of neuroepithelial stem cells. *J Neurosci Res* 53, 521-530.
- Forti, E., Aksanov, O., and Birk, R.Z. (2007). Temporal expression pattern of Bardet-Biedl syndrome genes in adipogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 1055-1062.
- Foufelle, F., and Ferre, P. (2002). New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J* 366, 377-391.
- Foufelle, F., Gouhot, B., Pegorier, J.P., Perdereau, D., Girard, J., and Ferre, P. (1992). Glucose stimulation of lipogenic enzyme gene expression in cultured white adipose tissue. A role for glucose 6-phosphate. *J Biol Chem* 267, 20543-20546.
- Fredrikson, G., Tornqvist, H., and Belfrage, P. (1986). Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta* 876, 288-293.
- Freytag, S.O., Paielli, D.L., and Gilbert, J.D. (1994). Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev* 8, 1654-1663.
- Friedland-Little, J.M., Hoffmann, A.D., Ocbina, P.J., Peterson, M.A., Bosman, J.D., Chen, Y., Cheng, S.Y., Anderson, K.V., and Moskowitz, I.P. (2011). A novel murine allele of Intraflagellar Transport

Protein 172 causes a syndrome including VACTERL-like features with hydrocephalus. *Hum Mol Genet* 20, 3725-3737.

- Friedman, J.M., and Halaas, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770.
- Fu, M., Sun, T., Bookout, A.L., Downes, M., Yu, R.T., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2005). A Nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol* 19, 2437-2450.
- Fujita H., A.C. (1970). Electron microscopy of the embryonic differentiation of fat cells. *Congres Micr Electr*, 3.
- Fukumura, D., Ushiyama, A., Duda, D.G., Xu, L., Tam, J., Krishna, V., Chatterjee, K., Garkavtsev, I., and Jain, R.K. (2003). Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. *Circ Res* 93, e88-97.
- Furuhashi, M., Fucho, R., Gorgun, C.Z., Tuncman, G., Cao, H., and Hotamisligil, G.S. (2008). Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *J Clin Invest* 118, 2640-2650.
- Furuhashi, M., and Hotamisligil, G.S. (2008). Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 7, 489-503.
- Gale, S.E., Frolov, A., Han, X., Bickel, P.E., Cao, L., Bowcock, A., Schaffer, J.E., and Ory, D.S. (2006). A regulatory role for 1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase 2 in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 281, 11082-11089.
- Galton, D.J. (1968). Lipogenesis in human adipose tissue. *J Lipid Res* 9, 19-26.
- Gao, Y.S., Hubbert, C.C., and Yao, T.P. (2010). The microtubule-associated histone deacetylase 6 (HDAC6) regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) endocytic trafficking and degradation. *J Biol Chem* 285, 11219-11226.
- Garcia-Carrizo, F., Nozhenko, Y., Palou, A., and Rodriguez, A.M. (2015). Leptin Effect on Acetylation and Phosphorylation of PGC1alpha in Muscle Cells Associated With AMPK and Akt Activation in High-Glucose Medium. *J Cell Physiol*.
- Garcia-Gonzalo, F.R., Corbit, K.C., Sirerol-Piquer, M.S., Ramaswami, G., Otto, E.A., Noriega, T.R., Seol, A.D., Robinson, J.F., Bennett, C.L., Josifova, D.J., *et al.* (2011). A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nat Genet* 43, 776-784.
- Gerdes, J.M., Christou-Savina, S., Xiong, Y., Moede, T., Moruzzi, N., Karlsson-Edlund, P., Leibiger, B., Leibiger, I.B., Ostenson, C.G., Beales, P.L., *et al.* (2014). Ciliary dysfunction impairs beta-cell insulin secretion and promotes development of type 2 diabetes in rodents. *Nat Commun* 5, 5308.
- Gerdes, J.M., Liu, Y., Zaghloul, N.A., Leitch, C.C., Lawson, S.S., Kato, M., Beachy, P.A., Beales, P.L., DeMartino, G.N., Fisher, S., *et al.* (2007). Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nat Genet* 39, 1350-1360.
- Ghossoub, R., Molla-Herman, A., Bastin, P., and Benmerah, A. (2011). The ciliary pocket: a once-forgotten membrane domain at the base of cilia. *Biol Cell* 103, 131-144.
- Gimeno, R.E. (2007). Fatty acid transport proteins. *Curr Opin Lipidol* 18, 271-276.
- Grousse, A., and Langin, D. (2012). Adipocyte lipases and lipid droplet-associated proteins: insight from transgenic mouse models. *Int J Obes (Lond)* 36, 581-594.
- Gluenz, E., Hoog, J.L., Smith, A.E., Dawe, H.R., Shaw, M.K., and Gull, K. (2010). Beyond 9+0: noncanonical axoneme structures characterize sensory cilia from protists to humans. *FASEB J* 24, 3117-3121.
- Goetz, S.C., Liem, K.F., Jr., and Anderson, K.V. (2012). The spinocerebellar ataxia-associated gene Tau tubulin kinase 2 controls the initiation of ciliogenesis. *Cell* 151, 847-858.
- Goldstein, B.J., Scalia, R.G., and Ma, X.L. (2009). Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 6, 27-35.

- Goodenough, U.W. (1989). Cyclic AMP enhances the sexual agglutinability of *Chlamydomonas flagella*. *J Cell Biol* 109, 247-252.
- Gradilone, S.A., Radtke, B.N., Bogert, P.S., Huang, B.Q., Gajdos, G.B., and LaRusso, N.F. (2013). HDAC6 inhibition restores ciliary expression and decreases tumor growth. *Cancer Res* 73, 2259-2270.
- Granneman, J.G., Moore, H.P., Krishnamoorthy, R., and Rathod, M. (2009). Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *J Biol Chem* 284, 34538-34544.
- Green, H., and Kehinde, O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5, 19-27.
- Green, H., and Meuth, M. (1974). An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3, 127-133.
- Griffiths, G.M., Tsun, A., and Stinchcombe, J.C. (2010). The immunological synapse: a focal point for endocytosis and exocytosis. *J Cell Biol* 189, 399-406.
- Grimaldi, B., Bellet, M.M., Katada, S., Astarita, G., Hirayama, J., Amin, R.H., Granneman, J.G., Piomelli, D., Leff, T., and Sassone-Corsi, P. (2010). PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPARgamma. *Cell Metab* 12, 509-520.
- Grozinger, C.M., Hassig, C.A., and Schreiber, S.L. (1999). Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4868-4873.
- Guadagni, F., Roselli, M., Martini, F., Spila, A., Riondino, S., D'Alessandro, R., Del Monte, G., Formica, V., Laudisi, A., Portarena, I., *et al.* (2009). Prognostic significance of serum adipokine levels in colorectal cancer patients. *Anticancer Res* 29, 3321-3327.
- Guan, H.P., Ishizuka, T., Chui, P.C., Lehrke, M., and Lazar, M.A. (2005). Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev* 19, 453-461.
- Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., *et al.* (2006). Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312, 734-737.
- Haggarty, S.J., Koeller, K.M., Wong, J.C., Grozinger, C.M., and Schreiber, S.L. (2003). Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4389-4394.
- Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (1998). Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1, 271-272.
- Haimo, L.T., and Rosenbaum, J.L. (1981). Cilia, flagella, and microtubules. *J Cell Biol* 91, 125s-130s.
- Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., and Friedman, J.M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269, 543-546.
- Harris, C., Roohk, D.J., Fitch, M., Boudignon, B.M., Halloran, B.P., and Hellerstein, M.K. (2013). Large increases in adipose triacylglycerol flux in Cushingoid CRH-Tg mice are explained by futile cycling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304, E282-293.
- Hauner, H., Entenmann, G., Wabitsch, M., Gaillard, D., Ailhaud, G., Negrel, R., and Pfeiffer, E.F. (1989). Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 84, 1663-1670.
- Hausberger, F. (1938). Quantitative studies on the development of transplanted fat tissue stores in rats. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 302, 26.
- Haycraft, C.J., Banizs, B., Aydin-Son, Y., Zhang, Q., Michaud, E.J., and Yoder, B.K. (2005). Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet* 1, e53.

- He, M., Subramanian, R., Bangs, F., Omelchenko, T., Liem, K.F., Jr., Kapoor, T.M., and Anderson, K.V. (2014). The kinesin-4 protein Kif7 regulates mammalian Hedgehog signalling by organizing the cilium tip compartment. *Nat Cell Biol* 16, 663-672.
- Heldin, C.H., and Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79, 1283-1316.
- Henegar, C., Tordjman, J., Achard, V., Lacasa, D., Cremer, I., Guerre-Millo, M., Poitou, C., Basdevant, A., Stich, V., Viguerie, N., *et al.* (2008). Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol* 9, R14.
- Hidaka, K., Ashizawa, N., Endoh, H., Watanabe, M., and Fukumoto, S. (1995). Fine structure of the cilia in the pancreatic duct of WBN/Kob rat. *Int J Pancreatol* 18, 207-213.
- Hildebrandt, F., Attanasio, M., and Otto, E. (2009). Nephronophthisis: disease mechanisms of a ciliopathy. *J Am Soc Nephrol* 20, 23-35.
- Hook, S.S., Orian, A., Cowley, S.M., and Eisenman, R.N. (2002). Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13425-13430.
- Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860-867.
- Hou, Y., Pazour, G.J., and Witman, G.B. (2004). A dynein light intermediate chain, D1bLIC, is required for retrograde intraflagellar transport. *Mol Biol Cell* 15, 4382-4394.
- Houde, C., Dickinson, R.J., Houtzager, V.M., Cullum, R., Montpetit, R., Metzler, M., Simpson, E.M., Roy, S., Hayden, M.R., Hoodless, P.A., *et al.* (2006). Hippo is essential for node cilia assembly and Sonic hedgehog signaling. *Dev Biol* 300, 523-533.
- Hu, E., Liang, P., and Spiegelman, B.M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271, 10697-10703.
- Hu, Q., Milenkovic, L., Jin, H., Scott, M.P., Nachury, M.V., Spiliotis, E.T., and Nelson, W.J. (2010). A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science* 329, 436-439.
- Huang-Doran, I., and Semple, R.K. (2010). Knockdown of the Alstrom syndrome-associated gene *Alms1* in 3T3-L1 preadipocytes impairs adipogenesis but has no effect on cell-autonomous insulin action. *Int J Obes (Lond)* 34, 1554-1558.
- Huang, K., Diener, D.R., and Rosenbaum, J.L. (2009). The ubiquitin conjugation system is involved in the disassembly of cilia and flagella. *J Cell Biol* 186, 601-613.
- Huang, L., Szymanska, K., Jensen, V.L., Janecke, A.R., Innes, A.M., Davis, E.E., Frosk, P., Li, C., Willer, J.R., Chodirker, B.N., *et al.* (2011). TMEM237 is mutated in individuals with a Joubert syndrome related disorder and expands the role of the TMEM family at the ciliary transition zone. *Am J Hum Genet* 89, 713-730.
- Huang, P., and Schier, A.F. (2009). Dampened Hedgehog signaling but normal Wnt signaling in zebrafish without cilia. *Development* 136, 3089-3098.
- Huangfu, D., and Anderson, K.V. (2005). Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11325-11330.
- Huangfu, D., Liu, A., Rakeem, A.S., Murcia, N.S., Niswander, L., and Anderson, K.V. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426, 83-87.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F., and Yao, T.P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455-458.
- Hui, C.C., and Joyner, A.L. (1993). A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the *Gli3* gene. *Nat Genet* 3, 241-246.
- Huijsman, E., van de Par, C., Economou, C., van der Poel, C., Lynch, G.S., Schoiswohl, G., Haemmerle, G., Zechner, R., and Watt, M.J. (2009). Adipose triacylglycerol lipase deletion alters

- whole body energy metabolism and impairs exercise performance in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E505-513.
- Hunnicutt, G.R., Kosfisz, M.G., and Snell, W.J. (1990). Cell body and flagellar agglutinins in *Chlamydomonas reinhardtii*: the cell body plasma membrane is a reservoir for agglutinins whose migration to the flagella is regulated by a functional barrier. *J Cell Biol* 111, 1605-1616.
 - Hussain, M.M. (2000). A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis* 148, 1-15.
 - Inoko, A., Matsuyama, M., Goto, H., Ohmuro-Matsuyama, Y., Hayashi, Y., Enomoto, M., Ibi, M., Urano, T., Yonemura, S., Kiyono, T., *et al.* (2012). Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. *J Cell Biol* 197, 391-405.
 - Insinna, C., Humby, M., Sedmak, T., Wolfrum, U., and Besharse, J.C. (2009). Different roles for KIF17 and kinesin II in photoreceptor development and maintenance. *Dev Dyn* 238, 2211-2222.
 - Iomini, C., Tejada, K., Mo, W., Vaananen, H., and Piperno, G. (2004). Primary cilia of human endothelial cells disassemble under laminar shear stress. *J Cell Biol* 164, 811-817.
 - Ishikawa, H., Kubo, A., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2005). Odf2-deficient mother centrioles lack distal/subdistal appendages and the ability to generate primary cilia. *Nat Cell Biol* 7, 517-524.
 - Iwata, A., Riley, B.E., Johnston, J.A., and Kopito, R.R. (2005). HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem* 280, 40282-40292.
 - Jacoby, M., Cox, J.J., Gayral, S., Hampshire, D.J., Ayub, M., Blockmans, M., Pernot, E., Kisseleva, M.V., Compere, P., Schiffmann, S.N., *et al.* (2009). INPP5E mutations cause primary cilium signaling defects, ciliary instability and ciliopathies in human and mouse. *Nat Genet* 41, 1027-1031.
 - Janke, C., and Bulinski, J.C. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 773-786.
 - Janke, C., and Kneussel, M. (2010). Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci* 33, 362-372.
 - Jeanrenaud, B. (1961). Dynamic aspects of adipose tissue metabolism: a review. *Metabolism* 10, 535-581.
 - Jia, J., Kolterud, A., Zeng, H., Hoover, A., Teglund, S., Toftgard, R., and Liu, A. (2009). Suppressor of Fused inhibits mammalian Hedgehog signaling in the absence of cilia. *Dev Biol* 330, 452-460.
 - Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T., and Mizushima, N. (2014). The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol Biol Cell* 25, 1327-1337.
 - Jing, K., and Lim, K. (2012). Why is autophagy important in human diseases? *Exp Mol Med* 44, 69-72.
 - Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., and Tobe, K. (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116, 1784-1792.
 - Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1, 15-25.
 - Kaneko, K., Ueki, K., Takahashi, N., Hashimoto, S., Okamoto, M., Awazawa, M., Okazaki, Y., Ohsugi, M., Inabe, K., Umehara, T., *et al.* (2010). Class IA phosphatidylinositol 3-kinase in pancreatic beta cells controls insulin secretion by multiple mechanisms. *Cell Metab* 12, 619-632.
 - Kaneshiro, E.S., Matesic, D.F., and Jayasimhulu, K. (1984). Characterizations of six ethanolamine sphingophospholipids from *Paramecium* cells and cilia. *J Lipid Res* 25, 369-377.
 - Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A., and Yao, T.P. (2003). The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115, 727-738.

- Kawai, M., Green, C.B., Lecka-Czernik, B., Douris, N., Gilbert, M.R., Kojima, S., Ackert-Bicknell, C., Garg, N., Horowitz, M.C., Adamo, M.L., *et al.* (2010). A circadian-regulated gene, Nocturnin, promotes adipogenesis by stimulating PPAR-gamma nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 10508-10513.
- Kawai, M., and Rosen, C.J. (2010). PPARgamma: a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis. *Nat Rev Endocrinol* **6**, 629-636.
- Kaya, K., Ramesha, C.S., and Thompson, G.A., Jr. (1984). On the formation of alpha-hydroxy fatty acids. Evidence for a direct hydroxylation of nonhydroxy fatty acid-containing sphingolipids. *J Biol Chem* **259**, 3548-3553.
- Kehinde, H.G.a.O. (1974). Sublines of Mouse 3T3 Cells That Accumulate Lipid. *Cell* **1**.
- Keophiphath, M., Achard, V., Henegar, C., Rouault, C., Clement, K., and Lacasa, D. (2009). Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Mol Endocrinol* **23**, 11-24.
- Kim, G.W., Li, L., Gorbani, M., You, L., and Yang, X.J. (2013). Mice lacking alpha-tubulin acetyltransferase 1 are viable but display alpha-tubulin acetylation deficiency and dentate gyrus distortion. *J Biol Chem* **288**, 20334-20350.
- Kim, H.B., Kumar, A., Wang, L., Liu, G.H., Keller, S.R., Lawrence, J.C., Jr., Finck, B.N., and Harris, T.E. (2010a). Lipin 1 represses NFATc4 transcriptional activity in adipocytes to inhibit secretion of inflammatory factors. *Mol Cell Biol* **30**, 3126-3139.
- Kim, J., Kato, M., and Beachy, P.A. (2009). Gli2 trafficking links Hedgehog-dependent activation of Smoothened in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21666-21671.
- Kim, J., Lee, J.E., Heynen-Genel, S., Suyama, E., Ono, K., Lee, K., Ideker, T., Aza-Blanc, P., and Gleeson, J.G. (2010b). Functional genomic screen for modulators of ciliogenesis and cilium length. *Nature* **464**, 1048-1051.
- Kim, J.B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K.M., Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B.B., and Spiegelman, B.M. (1998a). Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest* **101**, 1-9.
- Kim, J.B., and Spiegelman, B.M. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* **10**, 1096-1107.
- Kim, J.B., Wright, H.M., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998b). ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4333-4337.
- Kim, S., Zaghloul, N.A., Bubenshchikova, E., Oh, E.C., Rankin, S., Katsanis, N., Obara, T., and Tsiokas, L. (2011). Nde1-mediated inhibition of ciliogenesis affects cell cycle re-entry. *Nat Cell Biol* **13**, 351-360.
- Kim, S.K., Shindo, A., Park, T.J., Oh, E.C., Ghosh, S., Gray, R.S., Lewis, R.A., Johnson, C.A., Attie-Bittach, T., Katsanis, N., *et al.* (2010c). Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. *Science* **329**, 1337-1340.
- Klaus, A., and Birchmeier, W. (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 387-398.
- Klinghoffer, R.A., Hamilton, T.G., Hoch, R., and Soriano, P. (2002). An allelic series at the PDGFalphaR locus indicates unequal contributions of distinct signaling pathways during development. *Dev Cell* **2**, 103-113.
- Kobayashi, T., and Dynlacht, B.D. (2011). Regulating the transition from centriole to basal body. *J Cell Biol* **193**, 435-444.
- Kobayashi, T., Tsang, W.Y., Li, J., Lane, W., and Dynlacht, B.D. (2011). Centriolar kinesin Kif24 interacts with CP110 to remodel microtubules and regulate ciliogenesis. *Cell* **145**, 914-925.

- Koh, Y.J., Kang, S., Lee, H.J., Choi, T.S., Lee, H.S., Cho, C.H., and Koh, G.Y. (2007). Bone marrow-derived circulating progenitor cells fail to transdifferentiate into adipocytes in adult adipose tissues in mice. *J Clin Invest* **117**, 3684-3695.
- Koh, Y.K., Lee, M.Y., Kim, J.W., Kim, M., Moon, J.S., Lee, Y.J., Ahn, Y.H., and Kim, K.S. (2008). Lipin1 is a key factor for the maturation and maintenance of adipocytes in the regulatory network with CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *J Biol Chem* **283**, 34896-34906.
- Komaba, H., Igaki, N., Goto, S., Yokota, K., Doi, H., Takemoto, T., Kohno, M., Hirose, Y., and Goto, T. (2006). Increased serum high-molecular-weight complex of adiponectin in type 2 diabetic patients with impaired renal function. *Am J Nephrol* **26**, 476-482.
- Konno, A., Setou, M., and Ikegami, K. (2012). Ciliary and flagellar structure and function--their regulations by posttranslational modifications of axonemal tubulin. *Int Rev Cell Mol Biol* **294**, 133-170.
- Korner, A., Pazaitou-Panayiotou, K., Kelesidis, T., Kelesidis, I., Williams, C.J., Kaprara, A., Bullen, J., Neuwirth, A., Tseloni, S., Mitsiades, N., *et al.* (2007). Total and high-molecular-weight adiponectin in breast cancer: in vitro and in vivo studies. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 1041-1048.
- Koutnikova, H., Cock, T.A., Watanabe, M., Houten, S.M., Champy, M.F., Dierich, A., and Auwerx, J. (2003). Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR gamma hypomorphic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14457-14462.
- Kovacs, J.J., Murphy, P.J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.T., Nicchitta, C.V., Yoshida, M., Toft, D.O., Pratt, W.B., and Yao, T.P. (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* **18**, 601-607.
- Kozminski, K.G., Beech, P.L., and Rosenbaum, J.L. (1995). The Chlamydomonas kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J Cell Biol* **131**, 1517-1527.
- Krintel, C., Morgelin, M., Logan, D.T., and Holm, C. (2009). Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by protein kinase A in vitro promotes an increase in its hydrophobic surface area. *FEBS J* **276**, 4752-4762.
- Krintel, C., Osmark, P., Larsen, M.R., Resjo, S., Logan, D.T., and Holm, C. (2008). Ser649 and Ser650 are the major determinants of protein kinase A-mediated activation of human hormone-sensitive lipase against lipid substrates. *PLoS One* **3**, e3756.
- Kubo, A., Yuba-Kubo, A., Tsukita, S., Tsukita, S., and Amagai, M. (2008). Sentan: a novel specific component of the apical structure of vertebrate motile cilia. *Mol Biol Cell* **19**, 5338-5346.
- Kuchka, M.R., and Jarvik, J.W. (1982). Analysis of flagellar size control using a mutant of Chlamydomonas reinhardtii with a variable number of flagella. *J Cell Biol* **92**, 170-175.
- Kuhns, S., Schmidt, K.N., Reymann, J., Gilbert, D.F., Neuner, A., Hub, B., Carvalho, R., Wiedemann, P., Zentgraf, H., Erfle, H., *et al.* (2013). The microtubule affinity regulating kinase MARK4 promotes axoneme extension during early ciliogenesis. *J Cell Biol* **200**, 505-522.
- Kunitomo, H., and Iino, Y. (2008). Caenorhabditis elegans DYF-11, an orthologue of mammalian Traf3ip1/MIP-T3, is required for sensory cilia formation. *Genes Cells* **13**, 13-25.
- Kuzmochka, C., Abdou, H.S., Hache, R.J., and Atlas, E. (2014). Inactivation of histone deacetylase 1 (HDAC1) but not HDAC2 is required for the glucocorticoid-dependent CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha) expression and preadipocyte differentiation. *Endocrinology* **155**, 4762-4773.
- Lacasa, D., Taleb, S., Keophiphath, M., Miranville, A., and Clement, K. (2007). Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology* **148**, 868-877.

- Lafontan, M., and Berlan, M. (1993). Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res* 34, 1057-1091.
- Laharrague, P., and Casteilla, L. (2010). The emergence of adipocytes. *Endocr Dev* 19, 21-30.
- Lam, H.C., Cloonan, S.M., Bhashyam, A.R., Haspel, J.A., Singh, A., Sathirapongsasuti, J.F., Cervo, M., Yao, H., Chung, A.L., Mizumura, K., *et al.* (2013). Histone deacetylase 6-mediated selective autophagy regulates COPD-associated cilia dysfunction. *J Clin Invest* 123, 5212-5230.
- Lamb, C.A., Yoshimori, T., and Tooze, S.A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 759-774.
- Lang, K., and Ratke, J. (2009). Leptin and Adiponectin: new players in the field of tumor cell and leukocyte migration. *Cell Commun Signal* 7, 27.
- Langin, D. (2011). In and out: adipose tissue lipid turnover in obesity and dyslipidemia. *Cell Metab* 14, 569-570.
- Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J.G., Gorkiewicz, G., and Zechner, R. (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab* 3, 309-319.
- Le Lay, S., Blouin, C.M., Hajduch, E., and Dugail, I. (2009). Filling up adipocytes with lipids. Lessons from caveolin-1 deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1791, 514-518.
- Lechtreck, K.F., Johnson, E.C., Sakai, T., Cochran, D., Ballif, B.A., Rush, J., Pazour, G.J., Ikebe, M., and Witman, G.B. (2009a). The *Chlamydomonas reinhardtii* BBSome is an IFT cargo required for export of specific signaling proteins from flagella. *J Cell Biol* 187, 1117-1132.
- Lechtreck, K.F., Luro, S., Awata, J., and Witman, G.B. (2009b). HA-tagging of putative flagellar proteins in *Chlamydomonas reinhardtii* identifies a novel protein of intraflagellar transport complex B. *Cell Motil Cytoskeleton* 66, 469-482.
- LeDizet, M., and Piperno, G. (1987). Identification of an acetylation site of *Chlamydomonas* alpha-tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5720-5724.
- Lee, J.Y., and Yao, T.P. (2010). Quality control autophagy: a joint effort of ubiquitin, protein deacetylase and actin cytoskeleton. *Autophagy* 6, 555-557.
- Lemullos, M., Boisvieux-Ulrich, E., Laine, M.C., Chailley, B., and Sandoz, D. (1988). Development and functions of the cytoskeleton during ciliogenesis in metazoa. *Biol Cell* 63, 195-208.
- Lenghel, A.R., Kacso, I.M., Bondor, C.I., Rusu, C., Rahaian, R., and Gherman Caprioara, M. (2012). Intercellular adhesion molecule, plasma adiponectin and albuminuria in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 95, 55-61.
- Lewis, K.E., Drossopoulou, G., Paton, I.R., Morrice, D.R., Robertson, K.E., Burt, D.W., Ingham, P.W., and Tickle, C. (1999). Expression of ptc and gli genes in talpid3 suggests bifurcation in Shh pathway. *Development* 126, 2397-2407.
- Li, A., Saito, M., Chuang, J.Z., Tseng, Y.Y., Dedesma, C., Tomizawa, K., Kaitsuka, T., and Sung, C.H. (2011). Ciliary transition zone activation of phosphorylated Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors. *Nat Cell Biol* 13, 402-411.
- Li, C., Inglis, P.N., Leitch, C.C., Efimenko, E., Zaghloul, N.A., Mok, C.A., Davis, E.E., Bialas, N.J., Healey, M.P., Heon, E., *et al.* (2008a). An essential role for DYF-11/MIP-T3 in assembling functional intraflagellar transport complexes. *PLoS Genet* 4, e1000044.
- Li, D., Yea, S., Li, S., Chen, Z., Narla, G., Banck, M., Laborda, J., Tan, S., Friedman, J.M., Friedman, S.L., *et al.* (2005). Kruppel-like factor-6 promotes preadipocyte differentiation through histone deacetylase 3-dependent repression of DLK1. *J Biol Chem* 280, 26941-26952.
- Li, J.B., Gerdes, J.M., Haycraft, C.J., Fan, Y., Teslovich, T.M., May-Simera, H., Li, H., Blacque, O.E., Li, L., Leitch, C.C., *et al.* (2004). Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell* 117, 541-552.

- Li, L., Wei, D., Wang, Q., Pan, J., Liu, R., Zhang, X., and Bao, L. (2012). MEC-17 deficiency leads to reduced alpha-tubulin acetylation and impaired migration of cortical neurons. *J Neurosci* 32, 12673-12683.
- Li, Y., Zhang, X., Polakiewicz, R.D., Yao, T.P., and Comb, M.J. (2008b). HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced beta-catenin nuclear localization. *J Biol Chem* 283, 12686-12690.
- Liem, K.F., Jr., He, M., Ocbina, P.J., and Anderson, K.V. (2009). Mouse Kif7/Costal2 is a cilia-associated protein that regulates Sonic hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13377-13382.
- Lin, F., Hiesberger, T., Cordes, K., Sinclair, A.M., Goldstein, L.S., Somlo, S., and Igarashi, P. (2003). Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5286-5291.
- Lindstrand, A., Davis, E.E., Carvalho, C.M., Pehlivan, D., Willer, J.R., Tsai, I.C., Ramanathan, S., Zuppan, C., Sabo, A., Muzny, D., *et al.* (2014). Recurrent CNVs and SNVs at the NPHP1 locus contribute pathogenic alleles to Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* 94, 745-754.
- Liu, A., Wang, B., and Niswander, L.A. (2005). Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development* 132, 3103-3111.
- Liu, J., Divoux, A., Sun, J., Zhang, J., Clement, K., Glickman, J.N., Sukhova, G.K., Wolters, P.J., Du, J., Gorgun, C.Z., *et al.* (2009). Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med* 15, 940-945.
- Liu, Y., Palanivel, R., Rai, E., Park, M., Gabor, T.V., Scheid, M.P., Xu, A., and Sweeney, G. (2015). Adiponectin stimulates autophagy and reduces oxidative stress to enhance insulin sensitivity during high-fat diet feeding in mice. *Diabetes* 64, 36-48.
- Lobo, S., Wiczer, B.M., and Bernlohr, D.A. (2009). Functional analysis of long-chain acyl-CoA synthetase 1 in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 284, 18347-18356.
- Locke, M., Tinsley, C.L., Benson, M.A., and Blake, D.J. (2009). TRIM32 is an E3 ubiquitin ligase for dysbindin. *Hum Mol Genet* 18, 2344-2358.
- Loktev, A.V., and Jackson, P.K. (2013). Neuropeptide Y family receptors traffic via the Bardet-Biedl syndrome pathway to signal in neuronal primary cilia. *Cell Rep* 5, 1316-1329.
- Loktev, A.V., Zhang, Q., Beck, J.S., Searby, C.C., Scheetz, T.E., Bazan, J.F., Slusarski, D.C., Sheffield, V.C., Jackson, P.K., and Nachury, M.V. (2008). A BBSome subunit links ciliogenesis, microtubule stability, and acetylation. *Dev Cell* 15, 854-865.
- Loncar, D. (1991). Convertible adipose tissue in mice. *Cell Tissue Res* 266, 149-161.
- Longo, K.A., Wright, W.S., Kang, S., Gerin, I., Chiang, S.H., Lucas, P.C., Opp, M.R., and MacDougald, O.A. (2004). Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. *J Biol Chem* 279, 35503-35509.
- Love, D., Li, F.Q., Burke, M.C., Cyge, B., Ohmitsu, M., Cabello, J., Larson, J.E., Brody, S.L., Cohen, J.C., and Takemaru, K. (2010). Altered lung morphogenesis, epithelial cell differentiation and mechanics in mice deficient in the Wnt/beta-catenin antagonist Chibby. *PLoS One* 5, e13600.
- Luo, M., Cao, M., Kan, Y., Li, G., Snell, W., and Pan, J. (2011). The phosphorylation state of an aurora-like kinase marks the length of growing flagella in *Chlamydomonas*. *Curr Biol* 21, 586-591.
- Luo, Z., Saha, A.K., Xiang, X., and Ruderman, N.B. (2005). AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 26, 69-76.
- Magre, J., Delepine, M., Van Maldergem, L., Robert, J.J., Maassen, J.A., Meier, M., Panz, V.R., Kim, C.A., Toubiana-Rufi, N., Czernichow, P., *et al.* (2003). Prevalence of mutations in AGPAT2 among human lipodystrophies. *Diabetes* 52, 1573-1578.

- Mahjoub, M.R., Montpetit, B., Zhao, L., Finst, R.J., Goh, B., Kim, A.C., and Quarmby, L.M. (2002). The FA2 gene of *Chlamydomonas* encodes a NIMA family kinase with roles in cell cycle progression and microtubule severing during deflagellation. *J Cell Sci* **115**, 1759-1768.
- Mai, A., Massa, S., Pezzi, R., Simeoni, S., Rotili, D., Nebbioso, A., Scognamiglio, A., Altucci, L., Loidl, P., and Brosch, G. (2005). Class II (IIa)-selective histone deacetylase inhibitors. 1. Synthesis and biological evaluation of novel (aryloxopropenyl)pyrrolyl hydroxyamides. *J Med Chem* **48**, 3344-3353.
- Majka, S.M., Fox, K.E., Psilas, J.C., Helm, K.M., Childs, C.R., Acosta, A.S., Janssen, R.C., Friedman, J.E., Woessner, B.T., Shade, T.R., *et al.* (2010). De novo generation of white adipocytes from the myeloid lineage via mesenchymal intermediates is age, adipose depot, and gender specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14781-14786.
- Mancini, T., Kola, B., Mantero, F., Boscaro, M., and Arnaldi, G. (2004). High cardiovascular risk in patients with Cushing's syndrome according to 1999 WHO/ISH guidelines. *Clin Endocrinol (Oxf)* **61**, 768-777.
- Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., and Milligan, R.A. (1991). Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J Cell Biol* **114**, 977-991.
- Marion, V., Mockel, A., De Melo, C., Obringer, C., Claussmann, A., Simon, A., Messaddeq, N., Durand, M., Dupuis, L., Loeffler, J.P., *et al.* (2012). BBS-induced ciliary defect enhances adipogenesis, causing paradoxical higher-insulin sensitivity, glucose usage, and decreased inflammatory response. *Cell Metab* **16**, 363-377.
- Marion, V., Stoetzel, C., Schlicht, D., Messaddeq, N., Koch, M., Flori, E., Danse, J.M., Mandel, J.L., and Dollfus, H. (2009). Transient ciliogenesis involving Bardet-Biedl syndrome proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1820-1825.
- Marshall, J.D., Maffei, P., Collin, G.B., and Naggert, J.K. (2011). Alstrom syndrome: genetics and clinical overview. *Curr Genomics* **12**, 225-235.
- Marshall, W. (2002). Size control in dynamic organelles. *Trends Cell Biol* **12**, 414-419.
- Marshall, W.F., Qin, H., Rodrigo Brenni, M., and Rosenbaum, J.L. (2005). Flagellar length control system: testing a simple model based on intraflagellar transport and turnover. *Mol Biol Cell* **16**, 270-278.
- Marshall, W.F., and Rosenbaum, J.L. (2001). Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control. *J Cell Biol* **155**, 405-414.
- Marszalek, J.R., Ruiz-Lozano, P., Roberts, E., Chien, K.R., and Goldstein, L.S. (1999). Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5043-5048.
- Marumoto, T., Zhang, D., and Saya, H. (2005). Aurora-A - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer* **5**, 42-50.
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., *et al.* (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J* **21**, 6820-6831.
- May, S.R., Ashique, A.M., Karlen, M., Wang, B., Shen, Y., Zarbalis, K., Reiter, J., Ericson, J., and Peterson, A.S. (2005). Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev Biol* **287**, 378-389.
- McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1960). The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat Res* **13**, 115-125.

- McCullough, A.W. (1944). Evidence of the macrophagal origin of adipose cells in the white rat as shown by studies on straved animals. *J Morphol* 75, 8.
- Meirhaeghe, A., Fajas, L., Gouilleux, F., Cotel, D., Helbecque, N., Auwerx, J., and Amouyel, P. (2003). A functional polymorphism in a STAT5B site of the human PPAR gamma 3 gene promoter affects height and lipid metabolism in a French population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 289-294.
- Mesaros, A., Koralov, S.B., Rother, E., Wunderlich, F.T., Ernst, M.B., Barsh, G.S., Rajewsky, K., and Bruning, J.C. (2008). Activation of Stat3 signaling in AgRP neurons promotes locomotor activity. *Cell Metab* 7, 236-248.
- Mesland, D.A., Hoffman, J.L., Caligor, E., and Goodenough, U.W. (1980). Flagellar tip activation stimulated by membrane adhesions in *Chlamydomonas* gametes. *J Cell Biol* 84, 599-617.
- Miki, H., Okada, Y., and Hirokawa, N. (2005). Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol* 15, 467-476.
- Milenkovic, L., Scott, M.P., and Rohatgi, R. (2009). Lateral transport of Smoothed from the plasma membrane to the membrane of the cilium. *J Cell Biol* 187, 365-374.
- Miyoshi, H., Perfield, J.W., 2nd, Souza, S.C., Shen, W.J., Zhang, H.H., Stancheva, Z.S., Kraemer, F.B., Obin, M.S., and Greenberg, A.S. (2007). Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem* 282, 996-1002.
- Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147, 728-741.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 107-132.
- Moldes, M., Zuo, Y., Morrison, R.F., Silva, D., Park, B.H., Liu, J., and Farmer, S.R. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. *Biochem J* 376, 607-613.
- Molla-Herman, A., Ghossoub, R., Blisnick, T., Meunier, A., Serres, C., Silbermann, F., Emmerson, C., Romeo, K., Bourdoncle, P., Schmitt, A., *et al.* (2010). The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J Cell Sci* 123, 1785-1795.
- Montesano, R. (1979). Inhomogeneous distribution of filipin-sterol complexes in the ciliary membrane of rat tracheal epithelium. *Am J Anat* 156, 139-145.
- Moustaid, N., Beyer, R.S., and Sul, H.S. (1994). Identification of an insulin response element in the fatty acid synthase promoter. *J Biol Chem* 269, 5629-5634.
- Mueller, E., Drori, S., Aiyer, A., Yie, J., Sarraf, P., Chen, H., Hauser, S., Rosen, E.D., Ge, K., Roeder, R.G., *et al.* (2002). Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. *J Biol Chem* 277, 41925-41930.
- Mukhopadhyay, S., Wen, X., Chih, B., Nelson, C.D., Lane, W.S., Scales, S.J., and Jackson, P.K. (2010). TULP3 bridges the IFT-A complex and membrane phosphoinositides to promote trafficking of G protein-coupled receptors into primary cilia. *Genes Dev* 24, 2180-2193.
- Muresan, V., Lyass, A., and Schnapp, B.J. (1999). The kinesin motor KIF3A is a component of the presynaptic ribbon in vertebrate photoreceptors. *J Neurosci* 19, 1027-1037.
- Murphy, P.J., Morishima, Y., Kovacs, J.J., Yao, T.P., and Pratt, W.B. (2005). Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone. *J Biol Chem* 280, 33792-33799.
- Musgrave, A., de Wildt, P., van Etten, I., Pijst, H., Scholma, C., Kooyman, R., Homan, W., and van den Ende, H. (1986). Evidence for a functional membrane barrier in the transition zone between the flagellum and cell body of *Chlamydomonas eugametos* gametes. *Planta* 167, 544-553.

- Musri, M.M., Carmona, M.C., Hanzu, F.A., Kaliman, P., Gomis, R., and Parrizas, M. (2010). Histone demethylase LSD1 regulates adipogenesis. *J Biol Chem* 285, 30034-30041.
- Mykytyn, K., Mullins, R.F., Andrews, M., Chiang, A.P., Swiderski, R.E., Yang, B., Braun, T., Casavant, T., Stone, E.M., and Sheffield, V.C. (2004). Bardet-Biedl syndrome type 4 (BBS4)-null mice implicate Bbs4 in flagella formation but not global cilia assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8664-8669.
- Nachury, M.V., Loktev, A.V., Zhang, Q., Westlake, C.J., Peranen, J., Merdes, A., Slusarski, D.C., Scheller, R.H., Bazan, J.F., Sheffield, V.C., *et al.* (2007). A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* 129, 1201-1213.
- Nachury, M.V., Seeley, E.S., and Jin, H. (2010). Trafficking to the ciliary membrane: how to get across the periciliary diffusion barrier? *Annu Rev Cell Dev Biol* 26, 59-87.
- Nakae, J., Kitamura, T., Kitamura, Y., Biggs, W.H., 3rd, Arden, K.C., and Accili, D. (2003). The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell* 4, 119-129.
- Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, N.H., Mazda, T., and Tomita, M. (1996). Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem* 120, 803-812.
- Napolitano, L. (1963). The Differentiation of White Adipose Cells. An Electron Microscope Study. *J Cell Biol* 18, 663-679.
- Napolitano, L.M. (1965). Observations on the fine structure of adipose cells. *Ann N Y Acad Sci* 131, 34-42.
- Narita, K., Kozuka-Hata, H., Nonami, Y., Ao-Kondo, H., Suzuki, T., Nakamura, H., Yamakawa, K., Oyama, M., Inoue, T., and Takeda, S. (2012). Proteomic analysis of multiple primary cilia reveals a novel mode of ciliary development in mammals. *Biol Open* 1, 815-825.
- Nedergaard, J., Cannon, B., and Lindberg, O. (1977). Microcalorimetry of isolated mammalian cells. *Nature* 267, 518-520.
- Nicholls, D.G., and Locke, R.M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64, 1-64.
- Nishimura, D.Y., Fath, M., Mullins, R.F., Searby, C., Andrews, M., Davis, R., Andorf, J.L., Mykytyn, K., Swiderski, R.E., Yang, B., *et al.* (2004). Bbs2-null mice have neurosensory deficits, a defect in social dominance, and retinopathy associated with mislocalization of rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16588-16593.
- Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., and Hirokawa, N. (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95, 829-837.
- North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M., and Verdin, E. (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 11, 437-444.
- O'Regan, L., Blot, J., and Fry, A.M. (2007). Mitotic regulation by NIMA-related kinases. *Cell Div* 2, 25.
- Ocbina, P.J., and Anderson, K.V. (2008). Intraflagellar transport, cilia, and mammalian Hedgehog signaling: analysis in mouse embryonic fibroblasts. *Dev Dyn* 237, 2030-2038.
- Ocbina, P.J., Tuson, M., and Anderson, K.V. (2009). Primary cilia are not required for normal canonical Wnt signaling in the mouse embryo. *PLoS One* 4, e6839.
- Oh, E.C., and Katsanis, N. (2012). Cilia in vertebrate development and disease. *Development* 139, 443-448.
- Ohkawa, N., Sugisaki, S., Tokunaga, E., Fujitani, K., Hayasaka, T., Setou, M., and Inokuchi, K. (2008). N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development. *Genes Cells* 13, 1171-1183.

- Oishi, Y., Manabe, I., Tobe, K., Tsushima, K., Shindo, T., Fujiu, K., Nishimura, G., Maemura, K., Yamauchi, T., Kubota, N., *et al.* (2005). Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab* 1, 27-39.
- Okada, Y., Takeda, S., Tanaka, Y., Izpisua Belmonte, J.C., and Hirokawa, N. (2005). Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell* 121, 633-644.
- Omori, Y., Zhao, C., Saras, A., Mukhopadhyay, S., Kim, W., Furukawa, T., Sengupta, P., Veraksa, A., and Malicki, J. (2008). Elipsa is an early determinant of ciliogenesis that links the IFT particle to membrane-associated small GTPase Rab8. *Nat Cell Biol* 10, 437-444.
- Orentas, D.M., Hayes, J.E., Dyer, K.L., and Miller, R.H. (1999). Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Development* 126, 2419-2429.
- Orozco, J.T., Wedaman, K.P., Signor, D., Brown, H., Rose, L., and Scholey, J.M. (1999). Movement of motor and cargo along cilia. *Nature* 398, 674.
- Orsi, A., Razi, M., Dooley, H.C., Robinson, D., Weston, A.E., Collinson, L.M., and Tooze, S.A. (2012). Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol Biol Cell* 23, 1860-1873.
- Ou, G., Blacque, O.E., Snow, J.J., Leroux, M.R., and Scholey, J.M. (2005). Functional coordination of intraflagellar transport motors. *Nature* 436, 583-587.
- Ou, G., Koga, M., Blacque, O.E., Murayama, T., Ohshima, Y., Schafer, J.C., Li, C., Yoder, B.K., Leroux, M.R., and Scholey, J.M. (2007). Sensory ciliogenesis in *Caenorhabditis elegans*: assignment of IFT components into distinct modules based on transport and phenotypic profiles. *Mol Biol Cell* 18, 1554-1569.
- Ouedraogo, R., Gong, Y., Berzins, B., Wu, X., Mahadev, K., Hough, K., Chan, L., Goldstein, B.J., and Scalia, R. (2007). Adiponectin deficiency increases leukocyte-endothelium interactions via upregulation of endothelial cell adhesion molecules in vivo. *J Clin Invest* 117, 1718-1726.
- Ouedraogo, R., Wu, X., Xu, S.Q., Fuchsel, L., Motoshima, H., Mahadev, K., Hough, K., Scalia, R., and Goldstein, B.J. (2006). Adiponectin suppression of high-glucose-induced reactive oxygen species in vascular endothelial cells: evidence for involvement of a cAMP signaling pathway. *Diabetes* 55, 1840-1846.
- Ounjai, P., Kim, K.D., Liu, H., Dong, M., Tauscher, A.N., Witkowska, H.E., and Downing, K.H. (2013). Architectural insights into a ciliary partition. *Curr Biol* 23, 339-344.
- Paintrand, M., Moudjou, M., Delacroix, H., and Bornens, M. (1992). Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations. *J Struct Biol* 108, 107-128.
- Pampliega, O., Orhon, I., Patel, B., Sridhar, S., Diaz-Carretero, A., Beau, I., Codogno, P., Satir, B.H., Satir, P., and Cuervo, A.M. (2013). Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. *Nature* 502, 194-200.
- Pan, J., and Snell, W.J. (2002). Kinesin-II is required for flagellar sensory transduction during fertilization in *Chlamydomonas*. *Mol Biol Cell* 13, 1417-1426.
- Pan, J., and Snell, W.J. (2005). *Chlamydomonas* shortens its flagella by activating axonemal disassembly, stimulating IFT particle trafficking, and blocking anterograde cargo loading. *Dev Cell* 9, 431-438.
- Pan, J., Wang, Q., and Snell, W.J. (2004). An aurora kinase is essential for flagellar disassembly in *Chlamydomonas*. *Dev Cell* 6, 445-451.
- Pan, X., Ou, G., Civelekoglu-Scholey, G., Blacque, O.E., Endres, N.F., Tao, L., Mogilner, A., Leroux, M.R., Vale, R.D., and Scholey, J.M. (2006). Mechanism of transport of IFT particles in *C. elegans* cilia by the concerted action of kinesin-II and OSM-3 motors. *J Cell Biol* 174, 1035-1045.

- Pantoja, C., Huff, J.T., and Yamamoto, K.R. (2008). Glucocorticoid signaling defines a novel commitment state during adipogenesis in vitro. *Mol Biol Cell* 19, 4032-4041.
- Parker, J.D., Hilton, L.K., Diener, D.R., Rasi, M.Q., Mahjoub, M.R., Rosenbaum, J.L., and Quarmby, L.M. (2010). Centrioles are freed from cilia by severing prior to mitosis. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 425-430.
- Parker, J.D., and Quarmby, L.M. (2003). Chlamydomonas fla mutants reveal a link between deflagellation and intraflagellar transport. *BMC Cell Biol* 4, 11.
- Patel, M.S., Owen, O.E., Goldman, L.I., and Hanson, R.W. (1975). Fatty acid synthesis by human adipose tissue. *Metabolism* 24, 161-173.
- Pazour, G.J., Dickert, B.L., and Witman, G.B. (1999). The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly. *J Cell Biol* 144, 473-481.
- Pedersen, L.B., Miller, M.S., Geimer, S., Leitch, J.M., Rosenbaum, J.L., and Cole, D.G. (2005). Chlamydomonas IFT172 is encoded by FLA11, interacts with CrEB1, and regulates IFT at the flagellar tip. *Curr Biol* 15, 262-266.
- Pellemounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., and Collins, F. (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269, 540-543.
- Peterfy, M., Phan, J., Xu, P., and Reue, K. (2001). Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet* 27, 121-124.
- Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 285, 7153-7164.
- Phan, J., and Reue, K. (2005). Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metab* 1, 73-83.
- Piao, T., Luo, M., Wang, L., Guo, Y., Li, D., Li, P., Snell, W.J., and Pan, J. (2009). A microtubule depolymerizing kinesin functions during both flagellar disassembly and flagellar assembly in Chlamydomonas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4713-4718.
- Pietras, K., Sjoblom, T., Rubin, K., Heldin, C.H., and Ostman, A. (2003). PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell* 3, 439-443.
- Piperno, G., LeDizet, M., and Chang, X.J. (1987). Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J Cell Biol* 104, 289-302.
- Piperno, G., Siuda, E., Henderson, S., Segil, M., Vaananen, H., and Sassaroli, M. (1998). Distinct mutants of retrograde intraflagellar transport (IFT) share similar morphological and molecular defects. *J Cell Biol* 143, 1591-1601.
- Plaisant, M., Giorgetti-Peraldi, S., Gabrielson, M., Loubat, A., Dani, C., and Peraldi, P. (2011). Inhibition of hedgehog signaling decreases proliferation and clonogenicity of human mesenchymal stem cells. *PLoS One* 6, e16798.
- Ploegh, H.L. (2007). A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* 448, 435-438.
- Poole, C.A., Flint, M.H., and Beaumont, B.W. (1985). Analysis of the morphology and function of primary cilia in connective tissues: a cellular cybernetic probe? *Cell Motil* 5, 175-193.
- Postic, C., Dentin, R., Denechaud, P.D., and Girard, J. (2007). ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 27, 179-192.
- Prodromou, N.V., Thompson, C.L., Osborn, D.P., Cogger, K.F., Ashworth, R., Knight, M.M., Beales, P.L., and Chapple, J.P. (2012). Heat shock induces rapid resorption of primary cilia. *J Cell Sci* 125, 4297-4305.

- Przybylski, R.J. (1971). Occurrence of centrioles during skeletal and cardiac myogenesis. *J Cell Biol* 49, 214-221.
- Pugacheva, E.N., and Golemis, E.A. (2005). The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat Cell Biol* 7, 937-946.
- Pugacheva, E.N., Jablonski, S.A., Hartman, T.R., Henske, E.P., and Golemis, E.A. (2007). HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell* 129, 1351-1363.
- Qin, H., Diener, D.R., Geimer, S., Cole, D.G., and Rosenbaum, J.L. (2004). Intraflagellar transport (IFT) cargo: IFT transports flagellar precursors to the tip and turnover products to the cell body. *J Cell Biol* 164, 255-266.
- Qin, H., Wang, Z., Diener, D., and Rosenbaum, J. (2007). Intraflagellar transport protein 27 is a small G protein involved in cell-cycle control. *Curr Biol* 17, 193-202.
- Rahmouni, K., Fath, M.A., Seo, S., Thedens, D.R., Berry, C.J., Weiss, R., Nishimura, D.Y., and Sheffield, V.C. (2008). Leptin resistance contributes to obesity and hypertension in mouse models of Bardet-Biedl syndrome. *J Clin Invest* 118, 1458-1467.
- Rattner, J.B., Sciore, P., Ou, Y., van der Hoorn, F.A., and Lo, I.K. (2010). Primary cilia in fibroblast-like type B synoviocytes lie within a cilium pit: a site of endocytosis. *Histol Histopathol* 25, 865-875.
- Ravaut, C., Esteve, D., Villageois, P., Bouloumie, A., Dani, C., and Ladoux, A. (2015). IER3 Promotes Expansion of Adipose Progenitor Cells in Response to Changes in Distinct Microenvironmental Effectors. *Stem Cells* 33, 2564-2573.
- Ricquier, D., Gaillard, J.L., and Turc, J.M. (1979). Microcalorimetry of isolated mitochondria from brown adipose tissue. Effect of guanosine-di-phosphate. *FEBS Lett* 99, 203-206.
- Ricquier, D., and Kader, J.C. (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a soidum dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem Biophys Res Commun* 73, 577-583.
- Roberts, R., Hodson, L., Dennis, A.L., Neville, M.J., Humphreys, S.M., Harnden, K.E., Micklem, K.J., and Frayn, K.N. (2009). Markers of de novo lipogenesis in adipose tissue: associations with small adipocytes and insulin sensitivity in humans. *Diabetologia* 52, 882-890.
- Rochford, J.J. (2010). Molecular mechanisms controlling human adipose tissue development: insights from monogenic lipodystrophies. *Expert Rev Mol Med* 12, e24.
- Rochford, J.J., Semple, R.K., Laudes, M., Boyle, K.B., Christodoulides, C., Mulligan, C., Lelliott, C.J., Schinner, S., Hadaschik, D., Mahadevan, M., *et al.* (2004). ETO/MTG8 is an inhibitor of C/EBPbeta activity and a regulator of early adipogenesis. *Mol Cell Biol* 24, 9863-9872.
- Rodbell, M. (1964). Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *J Biol Chem* 239, 375-380.
- Rodeheffer, M.S., Birsoy, K., and Friedman, J.M. (2008). Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* 135, 240-249.
- Rodriguez, A.M., Pisani, D., Dechesne, C.A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J.Y., Wdziekonski, B., Villageois, A., Bagnis, C., Breitmayer, J.P., Groux, H., *et al.* (2005). Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 201, 1397-1405.
- Rohatgi, R., Milenkovic, L., and Scott, M.P. (2007). Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 317, 372-376.
- Rohatgi, R., and Snell, W.J. (2010). The ciliary membrane. *Curr Opin Cell Biol* 22, 541-546.
- Rosen, E.D., Hsu, C.H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M.W., Gonzalez, F.J., and Spiegelman, B.M. (2002). C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev* 16, 22-26.

- Rosen, E.D., and MacDougald, O.A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 885-896.
- Rosenbaum, J.L., and Child, F.M. (1967). Flagellar regeneration in protozoan flagellates. *J Cell Biol* 34, 345-364.
- Rosenbaum, J.L., Moulder, J.E., and Ringo, D.L. (1969). Flagellar elongation and shortening in *Chlamydomonas*. The use of cycloheximide and colchicine to study the synthesis and assembly of flagellar proteins. *J Cell Biol* 41, 600-619.
- Rosenbaum, J.L., and Witman, G.B. (2002). Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 813-825.
- Ross, A.J., May-Simera, H., Eichers, E.R., Kai, M., Hill, J., Jagger, D.J., Leitch, C.C., Chapple, J.P., Munro, P.M., Fisher, S., *et al.* (2005). Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet* 37, 1135-1140.
- Ross, S.E., Hemati, N., Longo, K.A., Bennett, C.N., Lucas, P.C., Erickson, R.L., and MacDougald, O.A. (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289, 950-953.
- Ruiz-Perez, V.L., Ide, S.E., Strom, T.M., Lorenz, B., Wilson, D., Woods, K., King, L., Francomano, C., Freisinger, P., Spranger, S., *et al.* (2000). Mutations in a new gene in Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acrodistal dysostosis. *Nat Genet* 24, 283-286.
- Ruiz-Perez, V.L., Tompson, S.W., Blair, H.J., Espinoza-Valdez, C., Lapunzina, P., Silva, E.O., Hamel, B., Gibbs, J.L., Young, I.D., Wright, M.J., *et al.* (2003). Mutations in two nonhomologous genes in a head-to-head configuration cause Ellis-van Creveld syndrome. *Am J Hum Genet* 72, 728-732.
- Saftig, P., Beertsen, W., and Eskelinen, E.L. (2008). LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy* 4, 510-512.
- Sang, L., Miller, J.J., Corbit, K.C., Giles, R.H., Brauer, M.J., Otto, E.A., Baye, L.M., Wen, X., Scales, S.J., Kwong, M., *et al.* (2011). Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways. *Cell* 145, 513-528.
- Santos-Carvalho, A., Aveleira, C.A., Elvas, F., Ambrosio, A.F., and Cavadas, C. (2013). Neuropeptide Y receptors Y1 and Y2 are present in neurons and glial cells in rat retinal cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54, 429-443.
- Sarpal, R., Todi, S.V., Sivan-Loukianova, E., Shirolkar, S., Subramanian, N., Raff, E.C., Erickson, J.W., Ray, K., and Eberl, D.F. (2003). *Drosophila* KAP interacts with the kinesin II motor subunit KLP64D to assemble chordotonal sensory cilia, but not sperm tails. *Curr Biol* 13, 1687-1696.
- Sasse, R., and Gull, K. (1988). Tubulin post-translational modifications and the construction of microtubular organelles in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 90 (Pt 4), 577-589.
- Schafer, J.C., Winkelbauer, M.E., Williams, C.L., Haycraft, C.J., Desmond, R.A., and Yoder, B.K. (2006). IFTA-2 is a conserved cilia protein involved in pathways regulating longevity and dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci* 119, 4088-4100.
- Scheja, L., Makowski, L., Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Shimshek, D.R., Meyers, D.S., Morgan, M., Parker, R.A., and Hotamisligil, G.S. (1999). Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in *ap2*^{-/-} mice. *Diabetes* 48, 1987-1994.
- Schmidt, T.I., Kleylein-Sohn, J., Westendorf, J., Le Clech, M., Lavoie, S.B., Stierhof, Y.D., and Nigg, E.A. (2009). Control of centriole length by CPAP and CP110. *Curr Biol* 19, 1005-1011.
- Schneider, L., Clement, C.A., Teilmann, S.C., Pazour, G.J., Hoffmann, E.K., Satir, P., and Christensen, S.T. (2005). PDGFR α signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Curr Biol* 15, 1861-1866.
- Schneider, M.J., Ulland, M., and Sloboda, R.D. (2008). A protein methylation pathway in *Chlamydomonas* flagella is active during flagellar resorption. *Mol Biol Cell* 19, 4319-4327.

- Schulz, T.J., Huang, P., Huang, T.L., Xue, R., McDougall, L.E., Townsend, K.L., Cypess, A.M., Mishina, Y., Gussoni, E., and Tseng, Y.H. (2013). Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature* 495, 379-383.
- Schwarz, E.J., Reginato, M.J., Shao, D., Krakow, S.L., and Lazar, M.A. (1997). Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPbeta-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 17, 1552-1561.
- Schweiger, M., Schoiswohl, G., Lass, A., Radner, F.P., Haemmerle, G., Malli, R., Graier, W., Cornaciu, I., Oberer, M., Salvayre, R., *et al.* (2008). The C-terminal region of human adipose triglyceride lipase affects enzyme activity and lipid droplet binding. *J Biol Chem* 283, 17211-17220.
- Sedmak, T., and Wolfrum, U. (2010). Intraflagellar transport molecules in ciliary and nonciliary cells of the retina. *J Cell Biol* 189, 171-186.
- Segretain, D. (1989). Endocytosis in spermatids during spermiogenesis of the mouse. *Biol Cell* 67, 289-298.
- Seibenhener, M.L., Babu, J.R., Geetha, T., Wong, H.C., Krishna, N.R., and Wooten, M.W. (2004). Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol* 24, 8055-8068.
- Seigneurin-Berny, D., Verdel, A., Curtet, S., Lemerrier, C., Garin, J., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2001). Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol* 21, 8035-8044.
- Sekiya, M., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Takeuchi, Y., Nakagawa, Y., Takahashi, H., Okazaki, H., Iizuka, Y., Ohashi, K., Gotoda, T., *et al.* (2007). SREBP-1-independent regulation of lipogenic gene expression in adipocytes. *J Lipid Res* 48, 1581-1591.
- Seo, S., Baye, L.M., Schulz, N.P., Beck, J.S., Zhang, Q., Slusarski, D.C., and Sheffield, V.C. (2010). BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1488-1493.
- Seo, S., Guo, D.F., Bugge, K., Morgan, D.A., Rahmouni, K., and Sheffield, V.C. (2009). Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Hum Mol Genet* 18, 1323-1331.
- Seydoux, J., and Girardier, L. (1977). Control of brown fat thermogenesis by the sympathetic nervous system. *Experientia* 33, 1128-1130.
- Shan, D., Li, J.L., Wu, L., Li, D., Hurov, J., Tobin, J.F., Gimeno, R.E., and Cao, J. (2010). GPAT3 and GPAT4 are regulated by insulin-stimulated phosphorylation and play distinct roles in adipogenesis. *J Lipid Res* 51, 1971-1981.
- Shanbhag, S.R., Muller, B., and Steinbrecht, R.A. (2000). Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster* 2. Internal organization and cellular architecture of olfactory sensilla. *Arthropod Struct Dev* 29, 211-229.
- Sharma, K., Ramachandrarao, S., Qiu, G., Usui, H.K., Zhu, Y., Dunn, S.R., Ouedraogo, R., Hough, K., McCue, P., Chan, L., *et al.* (2008). Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest* 118, 1645-1656.
- Sharma, N., Kosan, Z.A., Stallworth, J.E., Berbari, N.F., and Yoder, B.K. (2011). Soluble levels of cytosolic tubulin regulate ciliary length control. *Mol Biol Cell* 22, 806-816.
- Sharp, L.Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D.W., Tomoda, E., Ruiz, L., Hu, H., Wang, L., Pavlova, Z., Gilsanz, V., *et al.* (2012). Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* 7, e49452.
- Shi, X., Shi, W., Li, Q., Song, B., Wan, M., Bai, S., and Cao, X. (2003). A glucocorticoid-induced leucine-zipper protein, GILZ, inhibits adipogenesis of mesenchymal cells. *EMBO Rep* 4, 374-380.
- Shibutani, S.T., and Yoshimori, T. (2014). A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res* 24, 58-68.

- Shida, T., Cueva, J.G., Xu, Z., Goodman, M.B., and Nachury, M.V. (2010). The major alpha-tubulin K40 acetyltransferase alphaTAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 21517-21522.
- Shimomura, I., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Ikemoto, S., Bashmakov, Y., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1998). Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev* 12, 3182-3194.
- Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1997). Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest* 99, 838-845.
- Shrago, E., Spennetta, T., and Gordon, E. (1969). Fatty acid synthesis in human adipose tissue. *J Biol Chem* 244, 2761-2766.
- Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Kronig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O.A., Jenny, A., *et al.* (2005). Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat Genet* 37, 537-543.
- Singh, R., Xiang, Y., Wang, Y., Baikati, K., Cuervo, A.M., Luu, Y.K., Tang, Y., Pessin, J.E., Schwartz, G.J., and Czaja, M.J. (2009). Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J Clin Invest* 119, 3329-3339.
- Singla, V., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Reiter, J.F. (2010). Odf1, a human disease gene, regulates the length and distal structure of centrioles. *Dev Cell* 18, 410-424.
- Sisson, J.C., Ho, K.S., Suyama, K., and Scott, M.P. (1997). Costal2, a novel kinesin-related protein in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* 90, 235-245.
- Smith, A.J., Thompson, B.R., Sanders, M.A., and Bernlohr, D.A. (2007). Interaction of the adipocyte fatty acid-binding protein with the hormone-sensitive lipase: regulation by fatty acids and phosphorylation. *J Biol Chem* 282, 32424-32432.
- Smith, S. (1994). The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J* 8, 1248-1259.
- Smith, U.M., Consugar, M., Tee, L.J., McKee, B.M., Maina, E.N., Whelan, S., Morgan, N.V., Goranson, E., Gissen, P., Lillquist, S., *et al.* (2006). The transmembrane protein meckelin (MKS3) is mutated in Meckel-Gruber syndrome and the wpk rat. *Nat Genet* 38, 191-196.
- Snow, J.J., Ou, G., Gunnarson, A.L., Walker, M.R., Zhou, H.M., Brust-Mascher, I., and Scholey, J.M. (2004). Two anterograde intraflagellar transport motors cooperate to build sensory cilia on *C. elegans* neurons. *Nat Cell Biol* 6, 1109-1113.
- Song, L., and Dentler, W.L. (2001). Flagellar protein dynamics in *Chlamydomonas*. *J Biol Chem* 276, 29754-29763.
- Soriano, P. (1997). The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development* 124, 2691-2700.
- Sorokin, S. (1962). Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 15, 363-377.
- Sorokin, S.P. (1968). Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J Cell Sci* 3, 207-230.
- Soukas, A., Socci, N.D., Saatkamp, B.D., Novelli, S., and Friedman, J.M. (2001). Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 276, 34167-34174.
- Soupene, E., and Kuypers, F.A. (2008). Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. *Exp Biol Med (Maywood)* 233, 507-521.
- Souto-Padron, T., and de Souza, W. (1983). Freeze-fracture localization of filipin-cholesterol complexes in the plasma membrane of *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* 69, 129-137.

- Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T., *et al.* (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783-787.
- Spektor, A., Tsang, W.Y., Khoo, D., and Dynlacht, B.D. (2007). Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program. *Cell* 130, 678-690.
- Stephens, R.E. (1997). Synthesis and turnover of embryonic sea urchin ciliary proteins during selective inhibition of tubulin synthesis and assembly. *Mol Biol Cell* 8, 2187-2198.
- Stoops, J.K., Ross, P., Arslanian, M.J., Aune, K.C., Wakil, S.J., and Oliver, R.M. (1979). Physicochemical studies of the rat liver and adipose fatty acid synthetases. *J Biol Chem* 254, 7418-7426.
- Stottmann, R.W., Tran, P.V., Turbe-Doan, A., and Beier, D.R. (2009). Ttc21b is required to restrict sonic hedgehog activity in the developing mouse forebrain. *Dev Biol* 335, 166-178.
- Suh, J.M., Gao, X., McKay, J., McKay, R., Salo, Z., and Graff, J.M. (2006). Hedgehog signaling plays a conserved role in inhibiting fat formation. *Cell Metab* 3, 25-34.
- Sui, H., and Downing, K.H. (2006). Molecular architecture of axonemal microtubule doublets revealed by cryo-electron tomography. *Nature* 442, 475-478.
- Sun, X., Haley, J., Bulgakov, O.V., Cai, X., McGinnis, J., and Li, T. (2012). Tubby is required for trafficking G protein-coupled receptors to neuronal cilia. *Cilia* 1, 21.
- Tai, A.W., Chuang, J.Z., Bode, C., Wolfrum, U., and Sung, C.H. (1999). Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell* 97, 877-887.
- Takats, S., Pircs, K., Nagy, P., Varga, A., Karpati, M., Hegedus, K., Kramer, H., Kovacs, A.L., Sass, M., and Juhasz, G. (2014). Interaction of the HOPS complex with Syntaxin 17 mediates autophagosome clearance in Drosophila. *Mol Biol Cell* 25, 1338-1354.
- Takeda, S., and Narita, K. (2012). Structure and function of vertebrate cilia, towards a new taxonomy. *Differentiation* 83, S4-11.
- Takeuchi, K., and Reue, K. (2009). Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E1195-1209.
- Tan, P.L., Barr, T., Inglis, P.N., Mitsuma, N., Huang, S.M., Garcia-Gonzalez, M.A., Bradley, B.A., Coforio, S., Albrecht, P.J., Watnick, T., *et al.* (2007). Loss of Bardet Biedl syndrome proteins causes defects in peripheral sensory innervation and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17524-17529.
- Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J* 16, 7432-7443.
- Tang, L.L., Tang, X.H., Li, X., Yu, H.B., Xie, Z.G., Liu, X.Y., and Zhou, Z.G. (2014). Effect of high-fat or high-glucose diet on obesity and visceral adipose tissue in mice. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 36, 614-619.
- Tang, W., Zeve, D., Suh, J.M., Bosnakovski, D., Kyba, M., Hammer, R.E., Tallquist, M.D., and Graff, J.M. (2008). White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 322, 583-586.
- Tang, Z., Lin, M.G., Stowe, T.R., Chen, S., Zhu, M., Stearns, T., Franco, B., and Zhong, Q. (2013). Autophagy promotes primary ciliogenesis by removing OFD1 from centriolar satellites. *Nature* 502, 254-257.
- Tanti, J.F., Ceppo, F., Jager, J., and Berthou, F. (2012). Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, 181.
- Taschler, U., Radner, F.P., Heier, C., Schreiber, R., Schweiger, M., Schoiswohl, G., Preiss-Landl, K., Jaeger, D., Reiter, B., Koefeler, H.C., *et al.* (2011). Monoglyceride lipase deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance. *J Biol Chem* 286, 17467-17477.

- Tay, S.Y., Ingham, P.W., and Roy, S. (2005). A homologue of the *Drosophila* kinesin-like protein Costal2 regulates Hedgehog signal transduction in the vertebrate embryo. *Development* **132**, 625-634.
- Todaro, G.J., and Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* **17**, 299-313.
- Toldt, C. (1870). Contribution to the histology and physiology of adipose tissue. *Naturwiss* **62**, 12.
- Tong, Q., Dalgin, G., Xu, H., Ting, C.N., Leiden, J.M., and Hotamisligil, G.S. (2000). Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science* **290**, 134-138.
- Tong, Q., Tsai, J., Tan, G., Dalgin, G., and Hotamisligil, G.S. (2005). Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* **25**, 706-715.
- Tontonoz, P., Graves, R.A., Budavari, A.I., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Hu, E., Tempst, P., and Spiegelman, B.M. (1994a). Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Res* **22**, 5628-5634.
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I., and Spiegelman, B.M. (1994b). mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* **8**, 1224-1234.
- Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, B.M. (1994c). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **79**, 1147-1156.
- Tontonoz, P., Kim, J.B., Graves, R.A., and Spiegelman, B.M. (1993). ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol* **13**, 4753-4759.
- Tooze, S.A., Abada, A., and Elazar, Z. (2014). Endocytosis and autophagy: exploitation or cooperation? *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a018358.
- Torikata, C. (1988). The ciliary necklace--a transmission electron microscopic study using tannic acid-containing fixation. *J Ultrastruct Mol Struct Res* **101**, 210-214.
- Tormos, K.V., Anso, E., Hamanaka, R.B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B., and Chandel, N.S. (2011). Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metab* **14**, 537-544.
- Tran, A.D., Marmo, T.P., Salam, A.A., Che, S., Finkelstein, E., Kabarriti, R., Xenias, H.S., Mazitschek, R., Hubbert, C., Kawaguchi, Y., *et al.* (2007). HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *J Cell Sci* **120**, 1469-1479.
- Tran, P.V., Haycraft, C.J., Besschetnova, T.Y., Turbe-Doan, A., Stottmann, R.W., Herron, B.J., Chesebro, A.L., Qiu, H., Scherz, P.J., Shah, J.V., *et al.* (2008). THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nat Genet* **40**, 403-410.
- Tsao, C.C., and Gorovsky, M.A. (2008). Different effects of *Tetrahymena* IFT172 domains on anterograde and retrograde intraflagellar transport. *Mol Biol Cell* **19**, 1450-1461.
- Ueno, H., Ishikawa, T., Bui, K.H., Gonda, K., Ishikawa, T., and Yamaguchi, T. (2012). Mouse respiratory cilia with the asymmetric axonemal structure on sparsely distributed ciliary cells can generate overall directional flow. *Nanomedicine* **8**, 1081-1087.
- Uren, A., Yu, J.C., Gholami, N.S., Pierce, J.H., and Heidaran, M.A. (1994). The alpha PDGFR tyrosine kinase mediates locomotion of two different cell types through chemotaxis and chemokinesis. *Biochem Biophys Res Commun* **204**, 628-634.
- Uzbekov, R., and Prigent, C. (2007). Clockwise or anticlockwise? Turning the centriole triplets in the right direction! *FEBS Lett* **581**, 1251-1254.

- Uzbekov, R.E., Maurel, D.B., Aveline, P.C., Pallu, S., Benhamou, C.L., and Rochefort, G.Y. (2012). Centrosome fine ultrastructure of the osteocyte mechanosensitive primary cilium. *Microsc Microanal* 18, 1430-1441.
- Vaisse, C., Halaas, J.L., Horvath, C.M., Darnell, J.E., Jr., Stoffel, M., and Friedman, J.M. (1996). Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* 14, 95-97.
- Valente, E.M., Logan, C.V., Mougou-Zerelli, S., Lee, J.H., Silhavy, J.L., Brancati, F., Iannicelli, M., Travaglini, L., Romani, S., Illi, B., *et al.* (2010). Mutations in TMEM216 perturb ciliogenesis and cause Joubert, Meckel and related syndromes. *Nat Genet* 42, 619-625.
- Valente, E.M., Rosti, R.O., Gibbs, E., and Gleeson, J.G. (2014). Primary cilia in neurodevelopmental disorders. *Nat Rev Neurol* 10, 27-36.
- van Amerongen, R., and Nusse, R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136, 3205-3214.
- Vaughan, M. (1961). Effect of hormones on glucose metabolism in adipose tissue. *J Biol Chem* 236, 2196-2199.
- Verdel, A., Curtet, S., Brocard, M.P., Rousseaux, S., Lemerrier, C., Yoshida, M., and Khochbin, S. (2000). Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol* 10, 747-749.
- Verhey, K.J., and Gaertig, J. (2007). The tubulin code. *Cell Cycle* 6, 2152-2160.
- Vertino, A.M., Taylor-Jones, J.M., Longo, K.A., Bearden, E.D., Lane, T.F., McGehee, R.E., Jr., MacDougald, O.A., and Peterson, C.A. (2005). Wnt10b deficiency promotes coexpression of myogenic and adipogenic programs in myoblasts. *Mol Biol Cell* 16, 2039-2048.
- Vicente Lopez, M.A., Vazquez Garcia, M.N., Entrena, A., Olmedillas Lopez, S., Garcia-Arranz, M., Garcia-Olmo, D., and Zapata, A. (2011). Low doses of bone morphogenetic protein 4 increase the survival of human adipose-derived stem cells maintaining their stemness and multipotency. *Stem Cells Dev* 20, 1011-1019.
- Vieira, O.V., Gaus, K., Verkade, P., Fullekrug, J., Vaz, W.L., and Simons, K. (2006). FAPP2, cilium formation, and compartmentalization of the apical membrane in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18556-18561.
- Vierkotten, J., Dildrop, R., Peters, T., Wang, B., and Ruther, U. (2007). Ftm is a novel basal body protein of cilia involved in Shh signalling. *Development* 134, 2569-2577.
- Vodovar, N., Serres F., François A. (1971). Origine et évolution des adipocytes mésentériques du porcelet avant la naissance. Aspect ultrastructural. *J Micr* 11, 19.
- Wakil, S.J. (1989). Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry* 28, 4523-4530.
- Walden, T.B., Hansen, I.R., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2012). Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302, E19-31.
- Wang, G., Amanai, K., Wang, B., and Jiang, J. (2000). Interactions with Costal2 and suppressor of fused regulate nuclear translocation and activity of cubitus interruptus. *Genes Dev* 14, 2893-2905.
- Wang, J., and Lazar, M.A. (2008). Bifunctional role of Rev-erbalpha in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 28, 2213-2220.
- Wang, N.D., Finegold, M.J., Bradley, A., Ou, C.N., Abdelsayed, S.V., Wilde, M.D., Taylor, L.R., Wilson, D.R., and Darlington, G.J. (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269, 1108-1112.
- Wang, Y., Lam, J.B., Lam, K.S., Liu, J., Lam, M.C., Hoo, R.L., Wu, D., Cooper, G.J., and Xu, A. (2006). Adiponectin modulates the glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling pathway and

- attenuates mammary tumorigenesis of MDA-MB-231 cells in nude mice. *Cancer Res* 66, 11462-11470.
- Wang, Y., Zhou, Z., Walsh, C.T., and McMahon, A.P. (2009). Selective translocation of intracellular Smoothened to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2623-2628.
 - Ward, S., Thomson, N., White, J.G., and Brenner, S. (1975). Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol* 160, 313-337.
 - Wassermann, F. (1965). the Development of Adipose Tissue. In *Handbook of Physiology : Adipose Tissue*, AE Renold and GF Cahill, eds (Washington, DC: American Physiological Society), 13.
 - Weatherbee, S.D., Niswander, L.A., and Anderson, K.V. (2009). A mouse model for Meckel syndrome reveals Mks1 is required for ciliogenesis and Hedgehog signaling. *Hum Mol Genet* 18, 4565-4575.
 - Webber, W.A., and Lee, J. (1975). Fine structure of mammalian renal cilia. *Anat Rec* 182, 339-343.
 - Weems, J.C., Griesel, B.A., and Olson, A.L. (2012). Class II histone deacetylases downregulate GLUT4 transcription in response to increased cAMP signaling in cultured adipocytes and fasting mice. *Diabetes* 61, 1404-1414.
 - Wei, E.K., Giovannucci, E., Fuchs, C.S., Willett, W.C., and Mantzoros, C.S. (2005). Low plasma adiponectin levels and risk of colorectal cancer in men: a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 97, 1688-1694.
 - Wen, G.Y., Soifer, D., and Wisniewski, H.M. (1982). The doublet microtubules of rods of the rabbit retina. *Anat Embryol (Berl)* 165, 315-328.
 - Wendel, A.A., Lewin, T.M., and Coleman, R.A. (2009). Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1791, 501-506.
 - Wheatley, D.N. (1967). Cilia and centrioles of the rat adrenal cortex. *J Anat* 101, 223-237.
 - Williams, C.L., Li, C., Kida, K., Inglis, P.N., Mohan, S., Semenec, L., Bialas, N.J., Stupay, R.M., Chen, N., Blacque, O.E., *et al.* (2011). MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis. *J Cell Biol* 192, 1023-1041.
 - Wilson, C.W., Chen, M.H., and Chuang, P.T. (2009). Smoothened adopts multiple active and inactive conformations capable of trafficking to the primary cilium. *PLoS One* 4, e5182.
 - Winder, W.W., Wilson, H.A., Hardie, D.G., Rasmussen, B.B., Hutber, C.A., Call, G.B., Clayton, R.D., Conley, L.M., Yoon, S., and Zhou, B. (1997). Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase A. *J Appl Physiol* (1985) 82, 219-225.
 - Winkler, R., Benz, V., Clemenz, M., Bloch, M., Foryst-Ludwig, A., Wardat, S., Witte, N., Trappiel, M., Namsolleck, P., Mai, K., *et al.* (2012). Histone deacetylase 6 (HDAC6) is an essential modifier of glucocorticoid-induced hepatic gluconeogenesis. *Diabetes* 61, 513-523.
 - Witkowski, A., Joshi, A.K., and Smith, S. (2007). Coupling of the de novo fatty acid biosynthesis and lipoylation pathways in mammalian mitochondria. *J Biol Chem* 282, 14178-14185.
 - Wren, K.N., Craft, J.M., Tritschler, D., Schauer, A., Patel, D.K., Smith, E.F., Porter, M.E., Kner, P., and Lehtreck, K.F. (2013). A differential cargo-loading model of ciliary length regulation by IFT. *Curr Biol* 23, 2463-2471.
 - Wright, W.S., Longo, K.A., Dolinsky, V.W., Gerin, I., Kang, S., Bennett, C.N., Chiang, S.H., Prestwich, T.C., Gress, C., Burant, C.F., *et al.* (2007). Wnt10b inhibits obesity in ob/ob and agouti mice. *Diabetes* 56, 295-303.

- Wu, J., Bostrom, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., *et al.* (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366-376.
- Wu, J., Srinivasan, S.V., Neumann, J.C., and Lingrel, J.B. (2005). The KLF2 transcription factor does not affect the formation of preadipocytes but inhibits their differentiation into adipocytes. *Biochemistry* 44, 11098-11105.
- Wu, Q., Ortegon, A.M., Tsang, B., Doege, H., Feingold, K.R., and Stahl, A. (2006). FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol Cell Biol* 26, 3455-3467.
- Xue, B., Rim, J.S., Hogan, J.C., Coulter, A.A., Koza, R.A., and Kozak, L.P. (2007). Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J Lipid Res* 48, 41-51.
- Yamaguchi, T., Omatsu, N., Morimoto, E., Nakashima, H., Ueno, K., Tanaka, T., Satouchi, K., Hirose, F., and Osumi, T. (2007). CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation. *J Lipid Res* 48, 1078-1089.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., *et al.* (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762-769.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 12, 814-822.
- Yeh, W.C., Cao, Z., Classon, M., and McKnight, S.L. (1995). Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 9, 168-181.
- Yen, C.L., Stone, S.J., Koliwad, S., Harris, C., and Farese, R.V., Jr. (2008). Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res* 49, 2283-2301.
- Yin, Y., Bangs, F., Paton, I.R., Prescott, A., James, J., Davey, M.G., Whitley, P., Genikhovich, G., Technau, U., Burt, D.W., *et al.* (2009). The Talpid3 gene (KIAA0586) encodes a centrosomal protein that is essential for primary cilia formation. *Development* 136, 655-664.
- Young, P., Arch, J.R., and Ashwell, M. (1984). Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett* 167, 10-14.
- Youngstrom, T.G., and Bartness, T.J. (1995). Catecholaminergic innervation of white adipose tissue in Siberian hamsters. *Am J Physiol* 268, R744-751.
- Yu, C.Y., Mayba, O., Lee, J.V., Tran, J., Harris, C., Speed, T.P., and Wang, J.C. (2010a). Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor binding regions in adipocytes reveal gene network involved in triglyceride homeostasis. *PLoS One* 5, e15188.
- Yu, L., McPhee, C.K., Zheng, L., Mardones, G.A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., *et al.* (2010b). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* 465, 942-946.
- Yu, Y.H., and Ginsberg, H.N. (2004). The role of acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) in energy metabolism. *Ann Med* 36, 252-261.
- Yuan, Z., Li, Q., Luo, S., Liu, Z., Luo, D., Zhang, B., Zhang, D., Rao, P., and Xiao, J. (2015). PPARgamma and Wnt Signaling in Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther*.
- Zaghoul, N.A., and Katsanis, N. (2009). Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J Clin Invest* 119, 428-437.
- Zaragosi, L.E., Ailhaud, G., and Dani, C. (2006). Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells* 24, 2412-2419.

- Zaragosi, L.E., Wdziekonski, B., Villageois, P., Keophiphath, M., Maumus, M., Tchkonja, T., Bourlier, V., Mohsen-Kanson, T., Ladoux, A., Elabd, C., *et al.* (2010). Activin A plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes* 59, 2513-2521.
- Zavodszky, E., Vicinanza, M., and Rubinstein, D.C. (2013). Biology and trafficking of ATG9 and ATG16L1, two proteins that regulate autophagosome formation. *FEBS Lett* 587, 1988-1996.
- Zechner, R., Kienesberger, P.C., Haemmerle, G., Zimmermann, R., and Lass, A. (2009). Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res* 50, 3-21.
- Zhang, J., Fu, M., Cui, T., Xiong, C., Xu, K., Zhong, W., Xiao, Y., Floyd, D., Liang, J., Li, E., *et al.* (2004a). Selective disruption of PPAR γ 2 impairs the development of adipose tissue and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10703-10708.
- Zhang, J., Sprung, R., Pei, J., Tan, X., Kim, S., Zhu, H., Liu, C.F., Grishin, N.V., and Zhao, Y. (2009a). Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteomics* 8, 215-225.
- Zhang, J.W., Klemm, D.J., Vinson, C., and Lane, M.D. (2004b). Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein β gene during adipogenesis. *J Biol Chem* 279, 4471-4478.
- Zhang, Q., Davenport, J.R., Croyle, M.J., Haycraft, C.J., and Yoder, B.K. (2005). Disruption of IFT results in both exocrine and endocrine abnormalities in the pancreas of Tg737(orpk) mutant mice. *Lab Invest* 85, 45-64.
- Zhang, X., Yuan, Z., Zhang, Y., Yong, S., Salas-Burgos, A., Koomen, J., Olashaw, N., Parsons, J.T., Yang, X.J., Dent, S.R., *et al.* (2007). HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol Cell* 27, 197-213.
- Zhang, Y., Gilquin, B., Khochbin, S., and Matthias, P. (2006). Two catalytic domains are required for protein deacetylation. *J Biol Chem* 281, 2401-2404.
- Zhang, Y., Goldman, S., Baerga, R., Zhao, Y., Komatsu, M., and Jin, S. (2009b). Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19860-19865.
- Zhang, Y., Kwon, S., Yamaguchi, T., Cubizolles, F., Rousseaux, S., Kneissel, M., Cao, C., Li, N., Cheng, H.L., Chua, K., *et al.* (2008). Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol Cell Biol* 28, 1688-1701.
- Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S., and Matthias, P. (2003). HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J* 22, 1168-1179.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zhu, D., Shi, S., Wang, H., and Liao, K. (2009). Growth arrest induces primary-cilium formation and sensitizes IGF-1-receptor signaling during differentiation induction of 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Sci* 122, 2760-2768.
- Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J.R., Chen, X.N., Noya, D., Rao, M.S., and Reddy, J.K. (1995). Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor γ (mPPAR γ) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR γ isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7921-7925.
- Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., *et al.* (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306, 1383-1386.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13, 4279-4295.

- Zuo, X., Fogelgren, B., and Lipschutz, J.H. (2011). The small GTPase Cdc42 is necessary for primary ciliogenesis in renal tubular epithelial cells. *J Biol Chem* 286, 22469-22477.